



Interférence entre les processus mitotiques et la prise d'azote chez *Thalassiosira weissflogii*. Implications en modélisation et sur les flux globaux.

Christophe Mocquet

► To cite this version:

Christophe Mocquet. Interférence entre les processus mitotiques et la prise d'azote chez *Thalassiosira weissflogii*. Implications en modélisation et sur les flux globaux.. Océan, Atmosphère. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : . tel-00472581

HAL Id: tel-00472581

<https://theses.hal.science/tel-00472581>

Submitted on 12 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
(PARIS VI)**

Spécialité
**Sciences de l'Environnement
Océanographie et Environnements Marins**

Présentée par
M. Christophe MOCQUET

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Sujet de la thèse :

**Interférence entre les processus mitotiques et la prise d'azote chez
Thalassiosira weissflogii. Implications en modélisation et sur les flux globaux.**

soutenue le 3 décembre 2009 à Villefranche-sur-Mer.

devant le jury composé de :

M. **Antoine SCIANDRA**, Directeur de thèse

M. **Olivier BERNARD**, Directeur de thèse

M. **Pascal CLAQUIN**, Rapporteur

M. **Yves COLLOS**, Rapporteur

M. **Jean-Marc GUARINI**, Examineur

M. **Stéphan JACQUET**, Examineur

M. **Hugh MACINTYRE**, Examineur

M. **Maurizio RIBERA D'ALCALA**, Examineur



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
(PARIS VI)**

Spécialité
**Sciences de l'Environnement
Océanographie et Environnements Marins**

Présentée par
M. Christophe MOCQUET

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Sujet de la thèse :

**Interférence entre les processus mitotiques et la prise d'azote chez
Thalassiosira weissflogii. Implications en modélisation et sur les flux globaux.**

soutenue le 3 décembre 2009 à Villefranche-sur-Mer.
devant le jury composé de :

M. **Antoine SCIANDRA**, Directeur de thèse
M. **Olivier BERNARD**, Directeur de thèse
M. **Pascal CLAQUIN**, Rapporteur
M. **Yves COLLOS**, Rapporteur
M. **Jean-Marc GUARINI**, Examineur
M. **Stéphan JACQUET**, Examineur
M. **Hugh MACINTYRE**, Examineur
M. **Maurizio RIBERA D'ALCALA**, Examineur

Interférence entre les processus mitotiques et la prise d'azote chez *Thalassiosira weissflogii*. Implications en modélisation et sur les flux globaux.

(résumé détaillé)

Dans l'océan, l'azote constitue l'un des éléments majeurs limitant la croissance du phytoplancton, et l'étude des processus intervenant dans son acquisition est d'une importance capitale dans la compréhension des flux de matière. Il est maintenant reconnu que le modèle michaëlien, utilisé à l'origine pour représenter l'effet de la concentration d'un nutriment sur son taux d'absorption, s'avère insuffisant dans le cas où d'autres facteurs présentent des variations temporelles, comme la lumière en cycles diurnes. Dans ce cas, le statut physiologique (réserves nutritionnelles et énergétiques) intervient comme élément de régulation endogène. Le but de notre travail est d'identifier dans quelle mesure le cycle cellulaire conditionne lui aussi la prise d'azote, et, le cas échéant d'évaluer l'impact de cette propriété au niveau macroscopique. Pour cela, nous avons réalisé des expériences en cultures continues de la diatomée *Thalassiosira weissflogii* soumise à différentes conditions de lumière et d'azote. Un suivi à haute fréquence du cycle cellulaire, du nombre de cellules, de la concentration en nitrate, et des quotas en azote, carbone, chlorophylle α , glucides et protéines nous a permis de différencier les effets du cycle cellulaire de ceux des variables externes sur la prise de nitrate.

Nos résultats montrent que les forçages externes (lumière et nitrate) et le statut physiologique ne permettent pas à eux seuls d'expliquer le processus d'acquisition d'azote. Nous montrons que la mitose est un processus majeur à prendre en compte, puisqu'il s'accompagne d'une réduction de la prise de nitrates quelles que soient les conditions de croissance. Le point sous-jacent est la détermination de l'entrée en mitose des cellules dans la journée. Nous montrons que les conditions de croissance ont un impact sur la longueur du cycle cellulaire via des vérifications des statuts azoté et énergétique effectuées en G1 et G2. Nos résultats suggèrent toutefois qu'une horloge interne restreint la phase de division à deux fenêtres temporelles dans la journée, le statut physiologique des cellules ne déterminant que la proportion de la population qui entre en mitose au sein de chaque fenêtre.

Nos expériences montrent également que les conséquences macroscopiques de ces propriétés individuelles sont fonction du degré de synchronisation de la population (proportion de cellules effectuant simultanément leur mitose). Celui-ci est réduit lorsque les conditions nutritionnelles ou lumineuses deviennent sub-optimales pour la croissance, ce que nous interprétons comme étant la manifestation d'une variabilité individuelle exacerbée par des capacités d'acclimatation différentes. Les hypothèses et conclusions de ce travail sont ensuite discutées d'un point de vue évolutif. Finalement, nous proposons différents modèles du cycle cellulaire afin d'évaluer le gain de représentativité obtenu par une complexification des modèles de croissance classiques. Différents niveaux de complexité sont proposés à partir de nos hypothèses biologiques, et testés sur d'autres données.

Mots clés : acquisition d'azote, cycle cellulaire, synchronisation, statut physiologique, modélisation, phytoplancton, microalgues, diatomées, *Thalassiosira weissflogii*

Remerciements

Oui, la thèse est incontestablement synonyme d'enrichissement personnel. D'autant plus lorsqu'il nous est permis de construire son projet de A à Z, et que celui-ci conjugue différentes approches (ici expérimentale et numérique) et différentes échelles (des processus cellulaires jusqu'à leur impact sur l'écosystème). Je tiens donc, en tout premier lieu, à remercier mes directeurs de thèse, si complémentaires du point de vue de l'approche scientifique et de la méthode d'encadrement. Ainsi, j'adresse mes profonds remerciements à Antoine Sciandra (CNRS LOV) pour avoir été présent au quotidien, notamment au cours de la phase expérimentale et lors de la rédaction. Je le remercie pour la patience et la compréhension dont il a fait preuve au cours de notre collaboration, j'espère en sortir métamorphosé. Je remercie également Olivier Bernard (INRIA COMORE), qui m'a accompagné dans l'approche modélisation, notamment pour sa façon si ludique de pointer les divagations, et pour ses coups de pouce décisifs.

Je souhaite également remercier Pascal Claquin et Stéphan Jacquet d'avoir été mes parrains en me donnant leur point de vue scientifique au cours de ces trois années, et d'avoir accepté de faire partie du jury final. Je remercie Yves Collos, Jean-Marc Guarini, Hugh MacIntyre et Maurizio Ribera d'Alcala de me faire également l'honneur de porter un regard critique sur ce travail.

Mes remerciements vont également aux personnes qui m'ont apporté leur éclairage sur certains points clés, notamment Jean-Luc Gouzé, Pierre Masci et toute l'équipe COMORE (INRIA Sophia Antipolis), ainsi que Francois Lantoine et Louis Prieur.

Le volet expérimental de ce travail aura occupé une grande partie de ces trois années. Il n'aurait pu être réalisé sans l'appui technique d'un certain nombre de personnes que je souhaite maintenant remercier. A leur tête, je suis particulièrement reconnaissant envers Amélie Gelay qui, avec soin et gentillesse, m'a formé au dispositif expérimental (un brin complexe). Je la remercie pour ses explications techniques et pour son aide dans l'électronique et dans la programmation informatique. Je tiens également à remercier Francis Louis et Eric Tanguy pour les volets électroniques et prototypie. L'usage des différents instruments et techniques auxquels j'ai eu la chance d'accéder serait resté impénétrable sans l'implication de Marie-Emmanuelle Kerros (cytométrie en flux), Dominique Marie (marquage de l'ADN), Nathalie Leblond (CHN), et Isabelle Palazolli (Coulter). Enfin, merci à Thomas Lacour et Serena Esposito pour leur aide dans l'échantillonnage et merci à Amandine-Marie Labedan, Audrey Gueneugues et Myrvline Philistin pour leur renfort décisif dans l'analyse des échantillons.

Je n'oublie pas Jean-Yves Carval, Jean-Luc Prevost et Mickael Cayol, les marins de l'Observatoire, pour leur efficacité lors des prélèvements d'eau au point B. Et je remercie chaleureusement Isabelle Courtois, Corinne Poutier, Martine Fioroni, Evelyne Luciano et Laurence Touchon pour leur appui administratif et logistique.

Avant de mettre le point final à ces 236 pages, je souhaite souligner le caractère décisif qu'ont pu jouer certains personnages au cours de mon parcours académique, notamment Alain Saliot et Nathalie Janel.

Et puis, ces trois années de thèse se sont déroulées dans une ambiance formidable. Au sein du laboratoire et en dehors. Je tiens à rendre hommage à tous ceux qui, par leur présence enrichissante, m'ont apporté leur aide à leur façon, peut-être sans même le savoir.

Enfin, je souhaite dédicacer ce travail à mes parents, qui ont toujours été derrière moi, et qui m'ont toujours encouragé à poursuivre sur une voie qui leur était pourtant complètement inconnue. Merci.

Table des matières

Table des matières	7
Glossaire	13
0. Introduction.....	19
1. L'importance du phytoplancton dans l'Océan et la Biosphère	19
2. La réponse du phytoplancton au changement global	21
3. Contexte de départ	22
I. Le phytoplancton : éléments de connaissance introductifs.....	29
1. Eléments et processus impliqués dans la croissance du phytoplancton	29
1.1. La photosynthèse : produire de l'énergie et de la matière organique grâce au soleil.....	29
1.2. La respiration: récupérer l'énergie stockée par la photosynthèse	29
1.3. Les éléments influençant la croissance	31
1.4. Le processus d'assimilation d'azote	32
2. Contrôle de l'absorption d'azote chez les microalgues autotrophes	33
2.1. Effet des concentrations extracellulaires en nutriments	33
2.2. L'implication du statut physiologique	34
3. Le cycle cellulaire	36
3.1. Notion de cycle cellulaire	36
3.2. Impact du cycle cellulaire sur la croissance et l'absorption	37
3.3. Régulation du cycle cellulaire	38
4. Le rythme circadien endogène	40
4.1. Notion d'horloge interne.....	40
4.2. Origine évolutive	40
5. Suivre une cellule au niveau de la population : la synchronisation.....	42
5.1. Comment se synchronise une population.....	42
5.2. La synchronisation en milieu naturel	43
5.3. La synchronisation au laboratoire	43

II. Matériels et Méthodes 51

1. Représenter l'environnement au laboratoire.....	51
1.1. De l'océan au laboratoire	51
1.2. De la culture en batch à la culture continue	52
1.3. De l'équilibre au transitoire.....	55
2. Contrôler les conditions de croissance au laboratoire	56
2.1. Contrôler l'intensité et le signal lumineux	57
2.2. Contrôler l'apport en nitrate	57
2.3. Contrôler l'apport en carbone dissous.....	57
2.4. Contrôler la température	58
2.5. Contrôler l'absence de contamination.....	58
2.6. Homogénéiser la culture	59
3. Mesurer le système	59
4. Lisser, dériver et calculer	64
4.1. Que calcule-t-on à partir des mesures ?	64
4.2. Choisir les méthodes numériques	65
4.3. Évaluer la confiance.....	66
5. Choisir les acteurs et les conditions expérimentales	67
5.1. Choisir le meilleur candidat.....	67
5.2. Choisir les conditions de culture	69
5.3. Choisir les expériences à réaliser	70
6. Imaginer un descripteur original : le signal de Mitose	71

III. Conditionnement de l'acquisition d'azote par le cycle cellulaire.

77

1. Suivi du métabolisme en conditions non limitantes	77
1.1. Localisation des événements de mitose quotidien.....	78
1.2. Identification des phases d'acquisition de matière.....	81
1.3. Conclusions de ces premières observations	84
2. Suivi du métabolisme en conditions nutritionnelles ou lumineuses limitantes	85
2.1. Limitation par l'azote.....	85

2.2.	Limitation par la lumière	88
3.	Suivi du métabolisme lors d'un passage en lumière continu.....	94
3.1.	Localisation des phases de mitose	94
3.2.	Localisation des phases d'acquisition de matière	95
4.	Effet du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote : conclusions	97
IV.	Régulation de l'avancement du cycle cellulaire	101
1.	Avancement du cycle cellulaire en conditions non limitantes.....	101
2.	Effet de la disponibilité en azote, ou du quota en azote.....	102
2.1.	Avancement en conditions de limitation par l'azote	103
2.2.	Avancement en conditions de carence en azote	105
3.	Effet de la dose de lumière.....	106
3.1.	Effet d'une réduction modérée de la dose de lumière	107
3.2.	Effet d'une forte diminution de la dose de lumière	110
4.	Implication d'une horloge interne	110
4.1.	Conservation du timing de la division en environnement variable	110
4.2.	Conservation sous illumination continue des pics de division d'une population à croissance ultradienne	111
4.3.	Deux évènements, deux portes, deux ouvertures ?	113
4.4.	Comment l'horloge interne peut-elle influencer le cycle cellulaire ?	114
5.	Conclusions sur le contrôle de l'avancement du cycle cellulaire	114
V.	Conséquences macroscopiques des propriétés individuelles ..	119
1.	Effets d'une limitation nutritionnelle ou énergétique sur la synchronisation	120
1.1.	Effet d'une limitation de la croissance par l'azote	120
1.2.	Effet d'une limitation de la croissance par la lumière.....	122
2.	Effet d'une modification du signal lumineux sur la synchronisation.....	125
2.1.	Impact sur la croissance au niveau individuel.....	126
2.2.	Impact sur la synchronisation.....	128
2.3.	Impact sur les flux de matière à l'échelle de la population.....	128
3.	Quelles sont les conséquences macroscopiques de la synchronisation ?	130

VI. Intégration des effets du cycle cellulaire et du statut physiologique..... 135

- 1. Effet de l'état énergétique 135**
 - 1.1. Echelle horaire..... 135
 - 1.2. Echelle diurne 138
 - 1.3. Moyen terme..... 139
- 2. Effet de l'état nutritionnel..... 139**
 - 2.1. Echelle horaire..... 139
 - 2.2. Echelle diurne et moyen terme..... 142

VII. Prise en compte du cycle cellulaire dans la modélisation de la croissance phytoplanctonique 147

- 1. Modéliser la croissance phytoplanctonique 147**
 - 1.1. La modélisation mathématique de systèmes biologiques 147
 - 1.2. Les modèles de croissance et d'écosystème 147
 - 1.3. La croissance du phytoplancton modélisée 148
- 2. Construire un modèle simple 151**
 - 2.1. Construire un schéma conceptuel..... 151
 - 2.2. Résultats et comparaison aux données..... 152
- 3. Prendre en compte le cycle cellulaire 159**
 - 3.1. Construction d'un nouveau modèle à partir des insuffisances du modèle *LDBiom* 159
 - 3.2. Résultats et comparaison aux données..... 160
- 4. Conceptualiser l'hypothèse de la restriction temporelle de la division (*gating*) 169**
 - 4.1. Description du modèle 169
 - 4.2. Résultats et comparaison aux données de l'expérience *CL* 170
- 5. Validation sur d'autres jeux de données 170**
 - 5.1. Passage en lumière continue après acclimatation en cycle diurne d'une population limitée par l'azote..... 170
 - 5.2. Simulation de couches de mélange, croissance non limitée par l'azote..... 173
- 6. Intérêts de la prise en compte du cycle cellulaire 180**
- 7. Quelques améliorations utiles envisageables 182**

VIII. Discussion et Perspectives..... 189

1. A quoi correspond réellement le signal de mitose ? 189
2. De l'effet du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote 192
3. La mitose interfère t'elle également avec les processus d'acquisition de carbone ? 193
4. La synchronisation particulière de *Thalassiosira weissflogii* est elle un avantage évolutif ?
194
5. De l'impact écologique de nos hypothèses. 196

Bibliographie..... 205

Annexe 219

Glossaire

En fonction des domaines, certains termes employés dans ce manuscrit peuvent prendre différentes significations. Afin d'éviter toute confusion, nous souhaitons dès maintenant clarifier le sens que nous allons leur conférer.

acquisition d'azote : ensemble des processus conduisant à la biosynthèse des molécules azotées (=métabolisme de l'azote), comprenant l'absorption, la réduction et l'incorporation (=amination) de nutriments azotés.

croissance ultradienne / infradienne : Une « **croissance ultradienne** » correspond à un temps de génération inférieur à 24h. En d'autres termes, la population se divise en moyenne plus d'une fois par jour. Au contraire le temps de génération d'une « **croissance infradienne** » est supérieur à 24h.

cycles cellulaires / lumineux: Le **cycle cellulaire** est le cycle de vie des organismes qui planifie un certain nombre de processus au cours de la journée. Le **cycle lumineux** (*syn.* cycle lumineux diurne) se rapporte au signal d'éclairement d'une période de 24h. Le terme « cycle » employé seul se réfère au cycle cellulaire.

court terme / moyen terme : L'expression « **court terme** » fait référence à une échelle de temps « **horaire** », c.à.d. inférieure à 24h. Au contraire l'expression « **moyen terme** » correspond à une échelle de temps d'un ou plusieurs jours.

évènement majeur de division / de mitose : Correspond à un intervalle au cours duquel une proportion significative de la population se divise / est en mitose.

limitation / facteur limitant: le **facteur limitant** l'activité biologique est l'élément dont la disponibilité dans le milieu est la plus proche de sa valeur minimum permettant la croissance (Odum 1971). Par exemple, on parle de limitation par l'azote, de limitation azotée ou d'azote limitant quand la concentration en nutriments azotés (ici le nitrate) limite la croissance.

horloge interne / rythme interne / rythme circadien / oscillateur interne : Toutes ces expressions sont synonymes. Le mot « **circadien** » employé seul se rapporte à une période de 24h.

jour / diurne / journée : Les termes « **jour** » et « **diurne** » se rapportent à une période de 24h, sauf quand ils sont explicitement opposés aux termes « **nuit** » et « **nocturne** », dans ce cas ils désignent spécifiquement la période d'éclairement. Le terme « **journée** » fait référence à la période

d'éclairement. Par extension, l'expression « **seconde partie de journée** » fait référence à la période allant de 14h à 20h et « **fin de journée** » fait référence une période des quelques heures entourant le crépuscule (20h).

microalgues / phytoplancton / autotrophes : Ces termes sont ici synonymes et font référence aux **microorganismes photosynthétiques unicellulaires**.

porte / fenêtre temporelle : Ces termes sont ici synonymes, ils se réfèrent à la restriction temporelle de la division (ou **gating**). Dans le même contexte, « **intervalle** » est également synonyme.

simulé / observé : Dans le Chapitre VII, les « **simulations** » (représentation d'une réalité par un modèle) sont confrontées aux « **observations** » (issues de nos expériences).

statut physiologique : état d'une cellule vis-à-vis de son fonctionnement. Nous détaillons les aspects nutritionnels et énergétiques. L'**état nutritionnel** correspond au **quota en azote**, représenté par le rapport entre les contenus cellulaires en azote et carbone (=rapport N/C), il est lié à moyen terme à la disponibilité en nutriments azotés. L'**état énergétique** correspond à la disponibilité en énergie dans la cellule (= **pouvoir réducteur**), il est lié à court terme au cycle lumineux diurne et à moyen terme à la dose de lumière reçue.

subjectif : Sous illumination continue, les termes « **jour subjectif** » et « **journée subjective** » se réfèrent à l'intervalle d'éclairement du cycle lumineux diurne (8h – 20h). Idem pour les termes « **nuit subjectif** » (20h – 8h), « **aube subjective** » (autour de 8h) et « **crépuscule subjectif** » (autour de 20h).

synchronisation / synchrone : Le cycle cellulaire des individus qui composent une population « **synchronisée** » avance de façon « **synchrone** » (en même temps, en parallèle). Dans ce cas, mitose et division surviennent de façon « synchrone » dans la population.

taux de croissance / de division : Le terme de croissance peut faire référence à l'augmentation de la biomasse ou du nombre d'individus. Le premier aspect correspond à la biosynthèse des molécules organiques qui doit permettre à la cellule de doubler son contenu. Nous parlerons de **taux de croissance**. Quand nous ferons spécifiquement référence au carbone et à l'azote, nous parlerons de **taux de fixation de carbone** et de **taux d'acquisition d'azote**. L'augmentation du nombre d'individus est la conséquence directe de la division cellulaire, nous parlerons de **taux de division**.

Introduction



The Electric Brain, by ahermin

0. Introduction

1. L'importance du phytoplancton dans l'Océan et la Biosphère

La poésie épique d'Homère¹ fait largement référence aux reflets chatoyants des flots marins, dans lesquels le rouge, le mauve, le vert et le noir se joignent à un camaïeu de bleu. Ses protagonistes ne peuvent toutefois pressentir que ces nuances émanent grandement de la présence d'organismes vivants microscopiques. Les grecs anciens considèrent au contraire l'océan comme un monde globalement stérile et infécond dans lequel les quelques « êtres errants » (*planktos* en grec) se nourrissent du corps des noyés.

Le monde océanique abrite pourtant une grande biodiversité d'organismes (Gray 1997), et parmi eux, les autotrophes planctoniques (phytoplancton) sont responsables de la moitié de la production primaire planétaire. Utilisant l'énergie lumineuse pour assimiler des substances inorganiques (nutriments), ils représentent le premier maillon de la vie marine : **ce sont les producteurs primaires de la matière organique dans l'océan**. Dans les niveaux supérieurs du réseau trophique (Figure 1), les organismes récupèrent par ingestion l'énergie et les molécules organiques accumulées en amont par le phytoplancton. A leur mort, la décomposition bactérienne de la matière organique en nutriments entretient le système. De ce fait, toute modification intervenant au niveau du compartiment phytoplanctonique est susceptible de bouleverser la suite du réseau trophique. C'est pourquoi une part importante de la recherche en biologie marine s'applique à comprendre les mécanismes physiologiques de ces organismes.

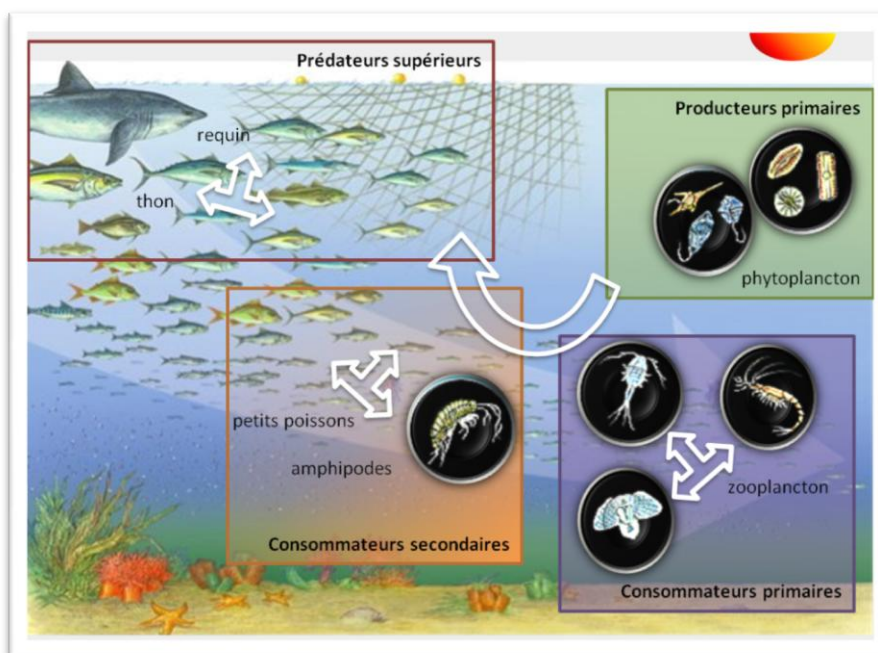


Figure 1. Représentation schématique d'un réseau trophique marin. Le premier maillon, le phytoplancton convertit les nutriments en matière organique grâce à l'énergie lumineuse. Matière et énergie seront transmises aux échelons supérieurs par ingestion jusqu'aux prédateurs supérieurs. Les représentants de chaque compartiment ne sont donnés qu'à titre d'exemple.

¹ nous parlons ici de l'*Illiad*e et de l'*Odysée*, œuvres d'Homère écrites aux alentours de 800 avant J.C.

Cet intérêt s'explique aussi par le fait que les autotrophes sont impliqués dans la **régulation climatique**. Par la photosynthèse, ils produisent un gaz vital pour la vie aérobie, le dioxygène (O_2), et consomment un des principaux gaz responsables de l'effet de serre sur Terre, le dioxyde carbone (CO_2). Or, le dernier rapport du GIEC¹ (2007) estime que « *l'essentiel de l'élévation de la température moyenne du globe observée depuis le milieu du XX^e siècle est très probablement attribuable à la hausse des concentrations de gaz à effet de serre anthropiques* ». Dans ce cadre, le phytoplancton prend le rôle d'un thermostat naturel en séquestrant presque un tiers du CO_2 libéré dans l'atmosphère par les activités humaines (GIEC 2007). Le principe de cette « pompe biologique » (Figure 2) repose sur la production primaire de la zone euphotique, qui transforme une partie du CO_2 dissous en carbone particulaire. Le transfert de cette matière dans le réseau trophique, et la sédimentation des particules, conduiront à son piégeage dans les profondeurs (Figure 2). Certains organismes phytoplanctoniques participent plus indirectement au refroidissement climatique en produisant du diméthylsulfure. Ce gaz diffuse dans l'atmosphère où il est transformé en aérosols (Del Valle *et al.* 2008) qui contribuent à la formation de nuage, et donc à la diminution du rayonnement solaire reçu sur Terre (Merzouk *et al.* 2004).

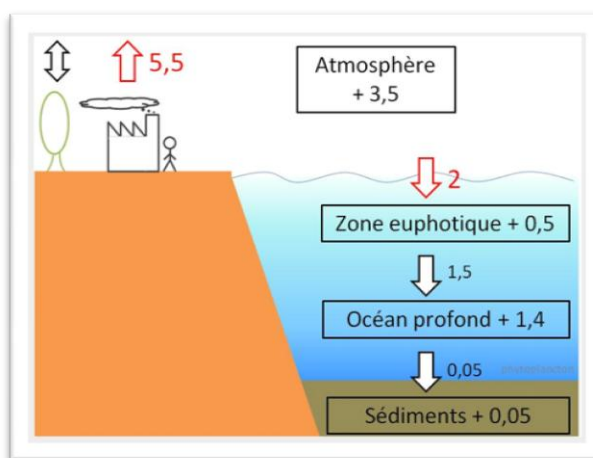


Figure 2. Flux et stockages de carbone liés à la « pompe biologique » (en Gt/an). Données GIEC 97.

Les activités humaines (industries, transport...) rejettent $5,5(\pm 0,5)$ GtC/an dans l'atmosphère. Les océans en captent $2(\pm 0,8)$ Gt, dont la majorité est stockée dans les couches profondes. La biomasse végétale terrestre équilibre ses flux de carbone avec l'atmosphère (0 ± 2 Gt/an). Au final, environ 3,5 GtC s'accumulent chaque année dans l'atmosphère et 1,4 Gt dans l'océan profond.

Les microalgues interfèrent également dans le domaine **économico-environnemental**. Certains dinoflagellés produisent des **toxines** ayant un effet délétère sur la santé humaine. En conchyliculture, l'accumulation de ces produits par les mollusques les rend régulièrement impropres à la consommation (Kris & Frémy 2002). Dans le domaine touristique, les efflorescences de certaines microalgues, dont les toxines sont ventilées dans l'atmosphère, conduisent les autorités publiques à interdire l'accès aux plages. Dans ce contexte, la présence d'*Ostreopsis ovata* est particulièrement surveillée dans le bassin Ligurien (Méditerranée Nord-Occidentale), où la palytoxine qu'elle sécrète est régulièrement responsable d'intoxications (Brescianini *et al.* 2006, Kermarec *et al.* 2008). Enfin, les efflorescences massives de certains dinoflagellés provoquent des « marées rouges ». Leur toxicité (comme *Karlodinium brevis*, Landsberg *et*

¹ GIEC : Groupe d'experts Intergouvernementaux sur l'Evolution du Climat. En anglais IPCC pour *Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cette organisation, rattachée à l'ONU, a pour mission de synthétiser les travaux portant sur le changement climatique. www.ipcc.ch

al. 2009) et leur effet anaérobisant (comme *Noctiluca*, Huang & Qi 1997) qui perturbent l'écosystème, l'économie (p. ex. le tourisme ou la pêche) et la santé publique.

A contrario, le phytoplancton peut se révéler être une **biomasse d'intérêt**. Des compléments alimentaires sont par exemple fabriqués à partir de la *Spiruline*, une cyanobactérie riche en protéines et vitamines (Pulz 2001). Des substances algales sont également utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme gélifiants et dans l'industrie pharmaceutique ou cosmétologique (Moreau *et al.* 2006). De plus, des tentatives d'exploitation biotechnologique de la croissance des microalgues sont à l'étude. Par exemple dans le domaine du traitement de l'eau, les substances à éliminer (p. ex. nitrates et phosphates) peuvent être utilisées et concentrées par ces micro-organismes (Quin *et al.* 2005). Enfin, un des grands défis actuels consiste en la production de biocarburant à partir des lipides synthétisés par certaines espèces phytoplanctoniques lors de leur croissance. Grâce à un turn-over quotidien et à une accumulation importante d'acides gras, les rendements prévus sont au moins 20 fois supérieurs à ceux des espèces oléagineuses terrestres comme le colza (Cadoret & Bernard 2008).

2. La réponse du phytoplancton au changement global

Les organismes phytoplanctoniques subissent passivement les variations des conditions de croissance. La lumière, la concentration en nutriments, la température, le pH et l'hydrodynamisme sont autant de facteurs qui agissent de concert sur leur métabolisme. Dans l'hypothèse actuelle d'un changement global de ces conditions, l'étude de la réponse physiologique des microalgues est primordiale pour prévoir celle de l'écosystème entier.

Exemple de ce changement global créé par l'Homme, le **réchauffement climatique** s'est invité au centre des préoccupations écologiques et politiques actuelles. Malgré l'effet modérateur exercé par les microalgues, la température de l'atmosphère s'est élevée d'un degré Celsius au cours du dernier siècle (Figure 3). Cette augmentation devrait s'accélérer dans les prochaines décennies (GIEC 2007), et comme la température de l'atmosphère se répercute par transfert d'énergie à l'océan (Gill 1982), des effets sont attendus sur les organismes marins. D'une part, la température joue un rôle direct dans le cycle de vie des organismes (Renaud *et al.* 2002, Lim *et al.* 2006), par exemple en modifiant la cinétique des réactions enzymatique. D'autre part, elle influe sur la dynamique

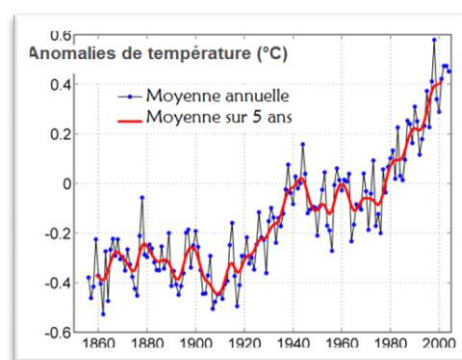


Figure 3. Evolution de la température globale depuis 1850. Anomalies de températures autour de la moyenne calculée entre 1850 et 2000.

de l'océan. Par exemple, une augmentation de la température doit conduire à un ralentissement de la circulation thermohaline (Gamo 1999, Archer *et al.* 2004) et à un renforcement de la stratification estivale de la colonne d'eau (McCormick 1990, Cox *et al.* 2000). Ces phénomènes affecteraient négativement la production primaire en diminuant les échanges verticaux et donc les apports nutritionnels dans la zone euphotique.

L'augmentation de la température n'est pas l'unique conséquence de l'apport massif de CO₂ dans l'atmosphère. Sa dissolution dans l'océan provoque des changements dans la chimie des carbonates qui aboutissent à une **acidification de la colonne d'eau**. Cette tendance menace l'intégrité de la coque externe des organismes calcaires végétaux (Riebesell *et al.* 2000, Delille *et al.* 2005) et animaux (Comeau *et al.* 2009), organismes moteurs de la pompe biologique (Baumann *et al.* 2004).

Enfin, l'agriculture intensive et l'évacuation des eaux usées provoquent un apport massif de nutriments dans les fleuves, voir directement dans les bassins. Ce déséquilibre trophique, appelé **eutrophisation**, cause dans certaines zones peu mélangées des proliférations massives de microalgues. Au-delà d'une biomasse critique, la production diurne d'oxygène ne compense plus sa consommation nocturne, provoquée par les processus de respiration et de dégradation. En conséquence, l'hypoxie du milieu défavorise la biodiversité et peut conduire à l'arrêt de la vie aérobie (Aminot *et al.* 2001).

3. Contexte de départ

La croissance d'une population, en termes d'augmentation de biomasse ou de nombre d'individus, résulte d'un grand nombre de processus cellulaires qui rendent son étude transdisciplinaire. Au niveau physiologique, les biologistes mesurent l'impact des conditions de croissance sur l'absorption de nutriments et sur leur conversion en matière organique. En amont, l'approche moléculaire consiste à comprendre la régulation de l'expression des gènes impliqués dans ces processus. Enfin, l'écologie étudie les processus de sélection qui permettent aux populations de maintenir ou non leur croissance en fonction des conditions environnementales.

Le carbone et l'azote sont les deux principaux éléments de la biomasse phytoplanctonique (rapport de Redfield C:N:P 106:16:1), et les concentrations en nutriments azotés limitent souvent la production primaire océanique (Vitousek & Howarth 1991). Le cadre de ce travail est la **compréhension des mécanismes qui régulent la cinétique d'acquisition d'azote des microalgues**. Ce type d'étude recouvre différentes échelles de temps. Sur une échelle supérieure à 24h, la cinétique

d'acquisition d'azote inorganique est généralement reliée à sa concentration dans le milieu (Caperon & Meyer 1972, MacIsaac & Dugdale 1972) et à la dose de lumière (Lim *et al.* 2006) par des fonctions saturantes de type michaelienne¹. A l'échelle diurne, elle est généralement expliquée par l'effet du flux de photons sur le statut physiologique (Needoba & Harrison 2004). Nous notons que l'implication du cycle cellulaire n'est pas particulièrement étudiée alors que certains indices laissent supposer l'existence d'un effet, direct ou indirect sur la cinétique d'acquisition d'azote. En effet, une réduction de la prise d'azote a pu être observée entre la fin de la journée et le début de la nuit, au moment où la population se divise (Raimbault & Mingazzini 1987, Pawloswski 2004). De plus, Hildebrand & Dahlin (2000) ont mis en évidence une variation diurne de l'expression du gène codant pour les transporteurs de nitrates qu'ils associèrent au cycle cellulaire.

Le but de cette étude est donc **d'examiner dans quelle mesure le cycle cellulaire conditionne l'acquisition d'azote des microalgues**. Deux approches sont utilisées, l'une est **expérimentale**, l'autre **numérique**. Dans un premier temps une série d'expériences en cultures continues sont conduites avec des conditions lumineuses et nutritionnelles diverses afin de limiter spécifiquement certaines voies métaboliques. Notre but est de découpler temporellement les processus qui participent à la croissance (acquisition d'azote et de carbone, cycle cellulaire...) pour faire apparaître leurs interférences. Dans un deuxième temps, les hypothèses issues de l'expérience nous permettent de représenter numériquement l'effet du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote et la croissance. La question est de déterminer si la prise en compte de l'effet du cycle cellulaire sur ces processus permet de mieux les représenter.

Ces deux approches permettront, dans ce manuscrit, d'explorer l'effet du cycle cellulaire à trois échelles spatiales, celles de la cellule, de la population, et de l'écosystème.

Dans un premier temps, nous chercherons une possible discontinuité de l'acquisition d'azote liée à l'avancement du cycle cellulaire (Chapitre III). Nous nous focaliserons sur une hypothétique interférence des processus de division sur la prise de nitrate.

Si l'impact du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote se vérifie, il nous apparaît intéressant d'identifier les mécanismes aboutissant à sa planification (Chapitre IV). Nous déterminerons l'effet des conditions environnementales et du statut physiologique sur la longueur relative des phases du cycle et nous chercherons l'effet possible d'une horloge interne sur la planification de la division.

¹ En référence à la courbe de Michaelis-Menten, liant la cinétique d'une réaction enzymatique à son substrat

Nous changerons ensuite d'échelle, en examinant les conditions permettant aux propriétés cellulaires d'avoir des conséquences macroscopiques. Nous examinerons les conditions qui affectent la synchronisation d'une population (**Chapitre V**).

Puis nous nous appliquerons à **intégrer l'effet particulier du cycle cellulaire dans la régulation globale de l'acquisition d'azote (chapitre VI).**

Finalement, **nous élargirons notre cadre de travail pour discuter de la validité de nos hypothèses en milieu océanique et de l'intérêt écologique des particularités de notre modèle biologique (Chapitre VIII).**

Et pour commencer, vous trouverez tous les éléments de connaissance nécessaires à la compréhension du manuscrit dans la partie suivante.

Chapitre I

Le phytoplancton :

éléments de connaissance introductifs



Climb high, by Vigg

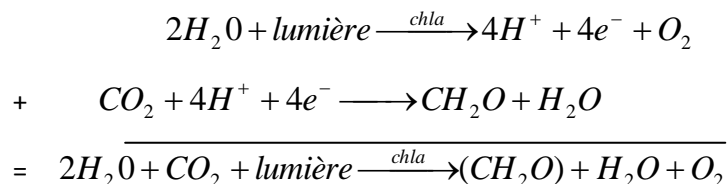
I. Le phytoplancton : éléments de connaissance introductifs

1. Éléments et processus impliqués dans la croissance du phytoplancton

1.1. La photosynthèse : produire de l'énergie et de la matière organique grâce au soleil

La photosynthèse est un processus convertissant 1/ l'énergie lumineuse en énergie biochimique, et 2/ la matière inorganique en matière organique. L'énergie est captée par des pigments au niveau des chloroplastes par excitation électronique. Cet état est instable et le retour à la normale s'effectue soit par la réduction de molécules au niveau des thylakoïdes (organelles du chloroplaste), soit par la dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence. Les processus de biosynthèse sont regroupés en deux phases dites 'claire' et 'sombre'. La première phase nécessite directement l'énergie lumineuse pour extraire un électron de la molécule d'eau. Dans le chloroplaste, le quantum d'énergie apporté par cet électron est converti sous forme chimique (Encadré 1). La seconde phase utilise l'énergie dégagée par la première pour incorporer le carbone inorganique, elle ne nécessite donc pas directement de flux de photons.

L'équation bilan de ces réactions (ci-dessous) montre que deux molécules d'eau s'associent à une molécule de dioxyde de carbone pour former, grâce à l'énergie lumineuse, une molécule organique de base (CH_2O) en libérant de l'eau et du dioxygène.



1.2. La respiration: récupérer l'énergie stockée par la photosynthèse

La nuit, l'énergie nécessaire à la poursuite des activités métaboliques provient de la dégradation des molécules constituées le jour. Les glucides, autrement appelés hydrates de carbone ou sucres, sont des molécules riches en carbone. Leur catabolisme a lieu en plusieurs phases et selon plusieurs voies. Dans le cytoplasme, le glucose est dégradé en pyruvate selon la voie de la glycolyse (Garrett & Grisham 2005) ou en molécules de plus faible poids moléculaire selon la voie des « pentoses phosphates » (Kruger & von Schaewen 2003).

Encadré 1. Les différentes phases de la photosynthèse.

Lors de la phase claire, l'état d'excitation électronique de la Chlorophylle a (Chla) au niveau du photosystème 2 (PS2) permet l'extraction d'un électron à partir de la molécule d'eau (donneur primaire). Cet électron servira à réduire le NADP^+ (accepteur terminal). Le transfert électronique passe par des complexes moléculaires (quinone, plastoquinone, cytochrome b6/f, plastocyanine) localisés sur la membrane du thylakoïde (Figure 5). La réduction de l'accepteur final intervient au niveau d'un deuxième centre réactionnel (PS1), elle permet de stocker du « pouvoir réducteur » dans la molécule de NADPH. L'oxydation de cette molécule libérera de l'énergie. De plus, le gradient de protons généré par ces processus entre l'intérieur (lumen) et l'extérieur (stroma) du thylakoïde est générateur d'ATP au niveau de l'ATPase (Figure 5). Ce gradient ne se crée qu'en présence de lumière. Le fonctionnement opérationnel de la chaîne de réaction (phosphorylation acyclique) produit de l' O_2 , de l'énergie et indirectement de la matière organique. En cas de dysfonctionnement en amont du PS1, le schéma est alors cyclique entre le PS1 et l'ATPase. Il y a une moindre synthèse d'énergie et donc de matière organique, et pas de synthèse d' O_2 .

L'ATP et le NADPH produits dans la phase claire sont utilisés dans la deuxième phase dite 'sombre'. Ces réactions se réalisent dans le stroma à travers le cycle de Calvin-Benson. Le carbone absorbé par la cellule sous forme de CO_2 ou de HCO_3^- par transport actif (Figure 4) est incorporé à un squelette carboné de ribulose-1,5-biP par une réaction de β -carboxylation (Figure 6). Cette réaction est catalysée par la Rubisco, une enzyme activée par la lumière (Bruyant et al. 2005). Le produit de cette réaction (Glycerate-3P) subit ensuite différentes réactions, où interviennent les molécules d'ATP et de NADPH, aboutissant à la formation d'une molécule de glucide.

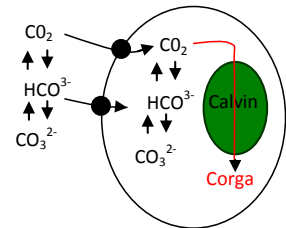


Figure 4. Mécanisme d'absorption de carbone inorganique dans la cellule.

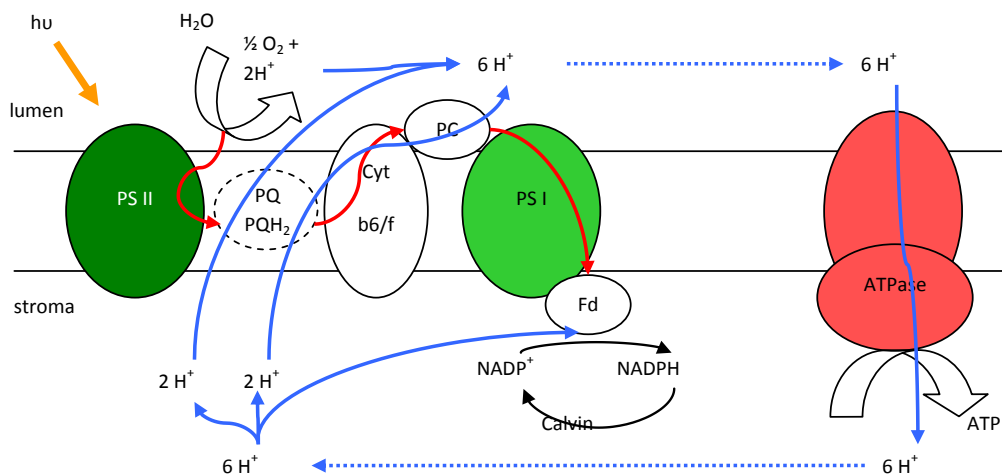


Figure 5. Schéma général du transport d'électron au niveau des thylakoides des chloroplastes.

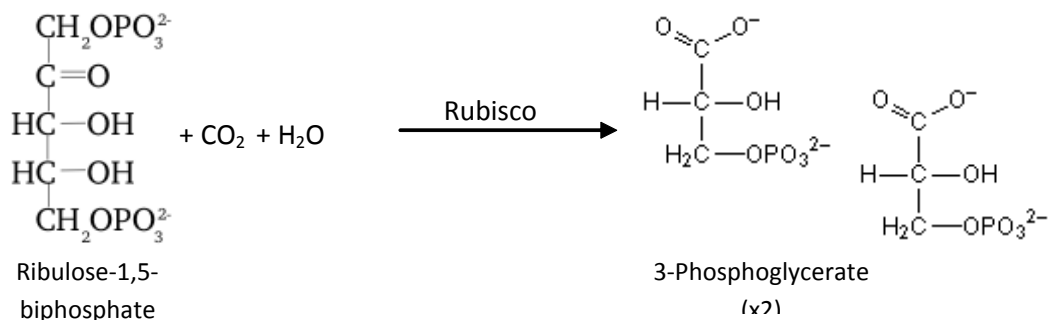
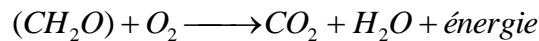


Figure 6. Incorporation de carbone inorganique sur un squelette de ribulose-1,5-bP par une réaction de carboxylation catalysée par la Rubisco.

Ces réactions sont exergoniques, c.à.d. qu'elles créent du pouvoir réducteur. Dans la mitochondrie, la dégradation du pyruvate dans le cycle de Krebs libère à son tour de l'énergie, à l'origine de la synthèse de l'ATP. Le bilan de ces réactions (équation suivante) est inverse à celui de la photosynthèse. La dégradation d'une molécule organique (CH_2O) consomme de l'oxygène pour produire de l'énergie, de l'eau et du dioxyde de carbone.



La mobilisation des lipides permet également de récupérer l'énergie investie lors de leur synthèse (Cuhel et al. 2004). Enfin, la désamination des protéines alimentant le cycle de Krebs, ces molécules sont également impliquées dans la production d'énergie nocturne (Audigé & Zonszain 1993). Nous noterons que la dégradation de ces molécules au cours de la nuit induit une variation dans la composition biochimique des cellules. L'anabolisme synthétise glucides, lipides et protéines le jour, et le catabolisme les consomme la nuit dans des proportions variables en fonction des conditions de croissance.

1.3. Les éléments influençant la croissance

La production primaire est fortement dépendante du **flux de photons** puisque la lumière est la base énergétique de tout processus dans la cellule phototrophe. Bien sûr, sa croissance est également liée à la disponibilité en éléments constitutifs. Parmi eux, **l'azote** et le **phosphore** sont les principaux éléments limitant la croissance phytoplanctonique (Vitousek & Howarth 1991, Conan et al. 2007). La **silice** peut également être responsable de la limitation des diatomées dans certaines zones océaniques, notamment à la fin d'une efflorescence (Escaravage & Prins 2002). Enfin, des éléments traces comme le fer ou le cuivre peuvent également faire défaut et limiter la production primaire. Ainsi, l'ajout de fer peut stimuler temporairement la production primaire dans certaines zones océaniques appelées HNLC (*High Nitrate Low Chlorophyll*) (Blain et al. 2007).

La **température** est impliquée dans la cinétique de la plupart des réactions biochimiques par son influence sur l'activité des enzymes (Holme & Peck 1998). Dans une certaine mesure, la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme augmente avec la température. Au-delà, une augmentation supplémentaire conduit à la dénaturation des enzymes (Prescott et al. 2003). Les microalgues présentent donc généralement un optimum de croissance plus ou moins ténu (Renayd et al. 2002, Katano et al. 2009).

1.4. Le processus d'assimilation d'azote

La forme prédominante d'azote dans l'océan est le diazote (N_2) que seuls les diazotrophes peuvent utiliser (Rabouille *et al.* 2006). En effet, l'assimilation de N_2 doit être catalysée par une enzyme particulière, la nitrogénase. **Pour la plupart des organismes autotrophes, les seules formes d'azote utilisables sont le nitrate (NO_3^-), le nitrite (NO_2^-) et l'ammonium (NH_4^+).**

La première étape consiste en l'**absorption** du nutriment dans la cellule. Les nitrates entrent par transport actif via un symport NO_3^-/H^+ (Figure 7, flèches bleues). Schématiquement, l'entrée de nitrate (chargé -) doit être couplée à celle de protons (chargés +). Ces derniers sont expulsés par une pompe à protons utilisant de l'ATP (Falkowski & Stone 1975). Le même système de symport sert au transport de nitrite, avec une affinité inférieure (Figure 7). L'absorption active de nitrite ne se fait donc qu'en l'absence de nitrate. Un système de transport à faible affinité (canaux anioniques) permet également, en deuxième ordre, l'échange de nitrate et nitrite avec l'extérieur (Figure 7,

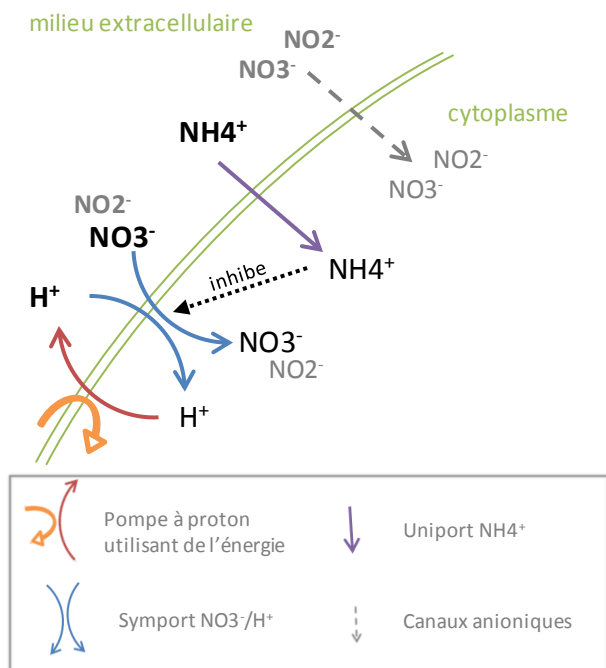


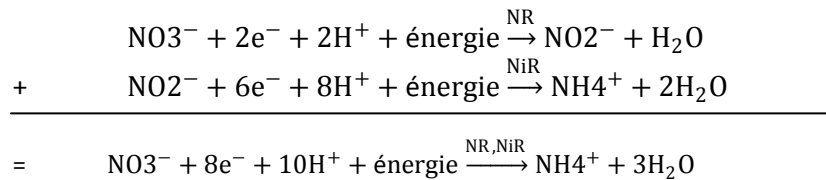
Figure 7. Systèmes de transport impliqués dans l'absorption de nutriments azotés chez les microalgues.

flèche grise). Enfin, l'entrée d'ammonium dans la cellule est facilitée par une protéine de transport sans utilisation d'énergie (Figure 7, flèche mauve). L'entrée d'ammonium (chargé +) tend à dépolariser la membrane et donc à inhiber le symport NO_3^-/H^+ (Ullrich 1992).

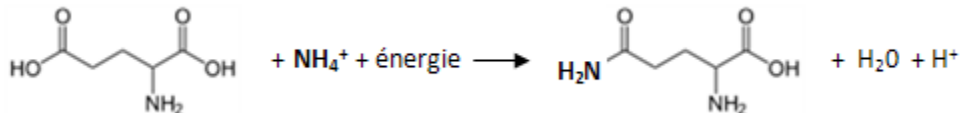
La suite du processus diffère en fonction de la forme absorbée (Figure 8). Puisque seul l'ammonium peut être finalement incorporé à un squelette carboné, le nitrate est **réduit** séquentiellement en nitrite puis en ammonium via des enzymes, respectivement la nitrate-réductase (NR) et la nitrite-réductase (NiR). Ces réactions (Équations 1) nécessitent du pouvoir réducteur (Falkowski & Stone 75), la première s'effectue dans le cytoplasme et la

seconde dans les chloroplastes (Figure 8). L'étape finale de l'assimilation consiste en l'incorporation de l'ammonium sur une molécule de glutamate, c'est l'amination (Équation 2, Figure 8).

Ces différents processus sont consommateurs d'énergie, sous forme d'ATP ou de pouvoir réducteur (flèches orange sur les Figure 8, Falkowski & Stone 1975, Turpin 1991).



Équations 1. Bilan de la réduction de nitrate en ammonium. Le nitrate est réduit successivement en nitrite grâce à la nitrate-réductase (NR) puis en ammonium grâce à la nitrite-réductase (NiR).



Équation 2. Réaction d'amination dans le chloroplaste. L'ammonium est incorporé sur un squelette carboné de glutamate pour former une molécule de glutamine.

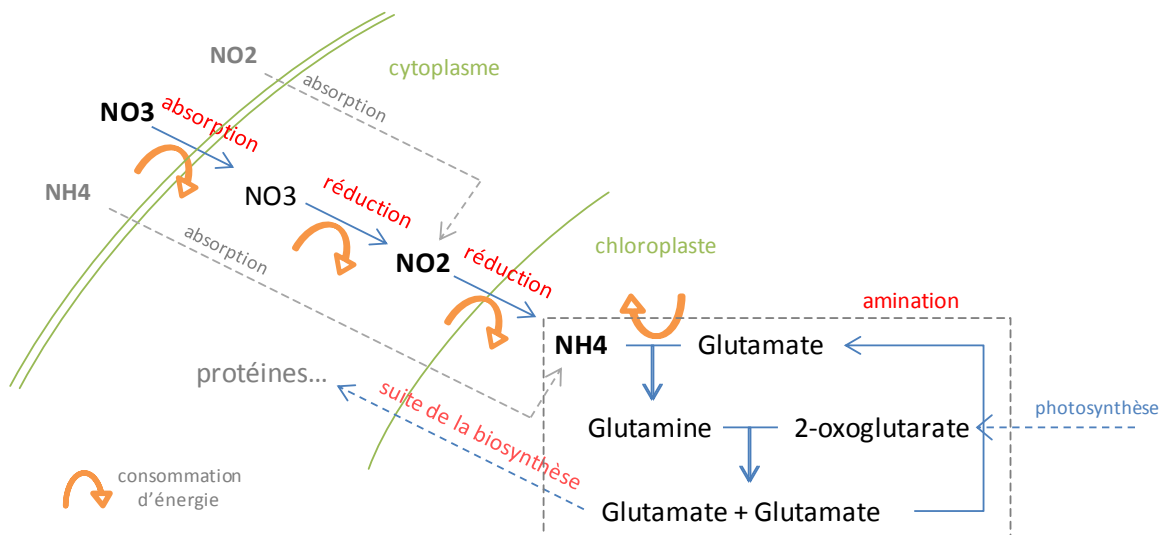


Figure 8. Schéma récapitulatif de l'utilisation d'azote chez un autotrophe planctonique. Nitrate et nitrite sont absorbés via le même système de transport actif dont l'affinité est plus forte pour le nitrate. L'ammonium est absorbé par un transport facilité qui inhibe le transport actif de nitrate. Le processus d'assimilation débute par la réduction du nitrate en nitrite dans le cytoplasme et du nitrite en ammonium dans le chloroplaste. L'ammonium est finalement incorporé à un squelette de glutamate, c'est l'amination. La glutamine formée se lie à une molécule de 2-oxoglutarate issue de cycle de Krebs pour former à nouveau 2 molécules de glutamate. L'une des deux molécules formées continue le processus de biosynthèse dans le cytoplasme et l'autre réalimente le cycle d'amination.

2. Contrôle de l'absorption d'azote chez les microalgues autotrophes

2.1. Effet des concentrations extracellulaires en nutriments

Le taux d'absorption des nutriments azotés (nitrate et ammonium) est relié dès les années 1960 à leurs concentrations dans le milieu (Caperon 1965, Dugdale 1967, Eppley *et al.* 1969). Pour

des expériences *in vitro* et *in situ*, la formulation la plus largement adoptée et validée est une loi monophasique saturante dite de '**Michaelis-Menten**' (Figure 9A, Caperon & Meyer 1972, MacIsaac & Dugdale 1972, Sarthoux 2005). Retrasscrivant mathématiquement l'hypothèse d'un transport facilité, elle fonctionne pour la plupart des nutriments azotés pouvant être absorbés par le phytoplancton.

Cependant, des études ultérieures mettent en évidence une réalité plus complexe où l'utilisation d'un substrat azoté ne peut se réduire à une simple loi de saturation. La loi de Michaelis-Menten est établie en étudiant individuellement l'absorption de chaque forme à faible concentration. Or, Collos *et al.* (2005) observent une réponse biphasique de l'absorption de nitrate de *Thalassiosira weissflogii* pour des concentrations supérieures à $50\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figure 9B), suggérant l'activation d'un transport actif secondaire. De plus, la concomitante présence de différents nutriments interfère sur leur absorption individuelle. Comme cela est expliqué précédemment, la présence d'ammonium inhibe fortement l'absorption de nitrate à des concentrations micromolaires (Figure 9C, MacIsaac & Dugdale 1972, Demanche *et al.* 1979, Lomas & Glibert 1999, Collos *et al.* 2004). Elle réduit également l'expression de la nitrate réductase (Vergara *et al.* 1998) et l'expression des gènes encodant les symports de nitrates (Kang *et al.* 2007). Enfin, puisque le nitrite utilise, avec une affinité moindre, le même système de transport que le nitrate, son absorption n'est sensible que pour des concentrations submicromolaires en nitrates (Sciandra et Amara 1994).

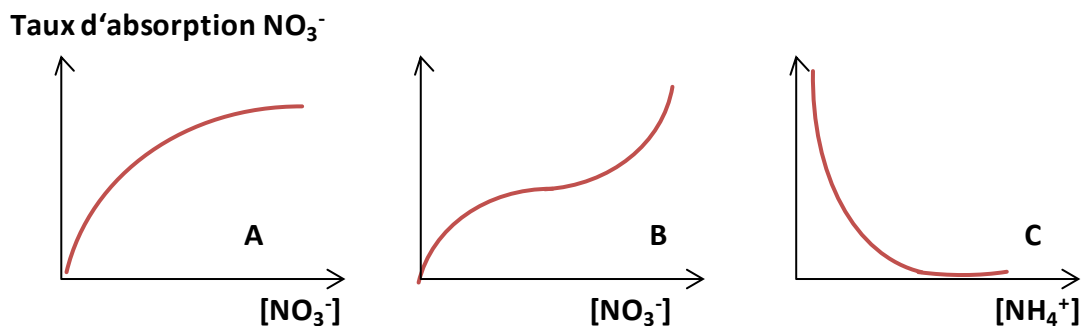


Figure 9. Illustration de l'impact de la concentration en nitrate et en ammonium sur le taux d'absorption de nitrate. A. Courbe de Michaelis-Menten. B. Comportement du taux d'absorption à haute concentration en nitrate (Collos *et al.* 2005). C. Inhibition de l'absorption de nitrate en présence d'ammonium.

2.2. L'implication du statut physiologique

Les variations des conditions de croissance ont un impact sur le statut physiologique de la cellule, qui constitue donc un autre niveau de régulation de l'acquisition d'azote. Nous distinguons l'état nutritionnel, représenté par le quota azoté (rapport N/C), de l'état énergétique lié aux réserves énergétiques de la cellule.

2.2.1. Etat nutritionnel

La fonction de Michaelis-Menten liant directement l'acquisition d'azote à sa disponibilité ne fonctionne qu'à quota azoté constant. En phase transitoire, cette représentation est donc caduque. Par exemple, l'apport de nitrates après une carence en azote met en évidence un phénomène d'acquisition d'urgence (*surge-uptake*) pendant lequel l'acquisition d'azote est accrue. Un délai séparant la levée de la limitation et l'acquisition d'azote est souvent observé (Collos 1984, Sciandra 1991). Il varie en fonction du quota en azote, c'est-à-dire de la durée et de l'intensité de la limitation qui a précédé (MacIsaac & Dugdale 1972, Collos *et al.* 1984, Dortch *et al.* 1991, Sciandra *et al.* 1994). Il peut refléter le temps nécessaire à la synthèse de nouveaux transporteurs, processus activé par la présence de nitrate à l'extérieur de la cellule (Hildebrand & Dahlin 2000, Kang *et al.* 2007).

2.2.2. Etat énergétique

L'énergie nécessaire au processus d'acquisition d'azote (Turpin *et al.* 1988, Turpin 1991) le rend dépendant du flux de photons (Falkowski *et al.* 1985, Vincent 1992, Needoba & Harrison 2004). Cependant, il peut être temporairement découplé de la présence de lumière grâce à la mobilisation des molécules de réserve, par exemple des glucides via la voie des pentoses phosphates (Vanlerberghe *et al.* 1992, Cf. p29).

Apparemment ubiquitaire chez les diatomées, cette caractéristique n'est pas évidente chez toutes les espèces. Des résultats contradictoires sont par exemple trouvés pour *Emiliania huxleyi* (Eppley *et al.* 1971, Needoba & Harrison 2004). Notons également que certaines études mettent en évidence une accumulation de nitrate dans la cellule à l'obscurité, suggérant que l'assimilation de l'azote absorbé de nuit n'a lieu qu'au cours de la phase de jour suivante (Raimbault & Mingazzini 1987, Marsot *et al.* 1992, Lomas & Glibert 2000).

2.2.3. Interférences entre les états énergétique et nutritionnel

La lumière et l'azote affectent individuellement le statut physiologique mais leur combinaison n'est pas linéaire.

Dans le cas d'une limitation par la lumière, un phénomène d'acclimatation se traduit par une augmentation du pool pigmentaire. Ce phénomène est démontré chez des cyanobactéries (Zevenboom *et al.* 1980, Healey 1985) et des microalgues eucaryotes (Rhee & Gotham 1981, Thompson *et al.* 1989, Sciandra *et al.* 1997, Needoba & Harrison 2004). *In fine*, l'effet d'une limitation en lumière sur l'acquisition d'azote dépend également du statut nutritionnel de la cellule.

Dans un milieu riche en azote, cet élément est principalement acquis de jour. La part nocturne tend à augmenter avec le degré de limitation en azote (Eppley *et al.* 1971, Wheeler *et al.* 1983, Cochlan *et al.* 1991, Marsot *et al.* 1992). Ainsi, la capacité à acquérir l'azote de nuit permet à la

cellule de compléter son quota azoté quand les conditions nutritionnelles sont défavorables. Or, cette capacité dépend des réserves accumulées de jour, et donc de la dose de lumière reçue (Beardall *et al.* 1994). Ainsi, l'acquisition d'azote d'une population limitée en azote dépend également du statut énergétique de la cellule.

3. Le cycle cellulaire

3.1. Notion de cycle cellulaire

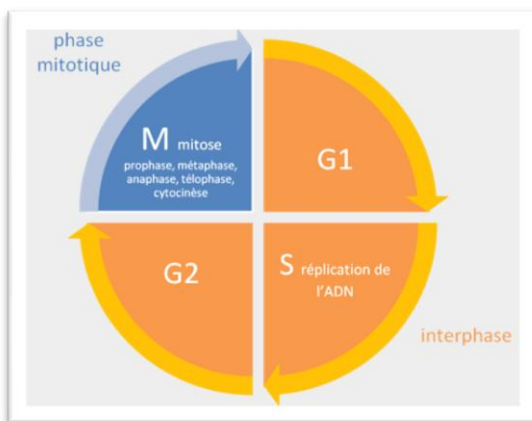


Figure 10. Le cycle cellulaire. En bleu, la phase mitotique regroupe les processus de division nucléaire et cellulaire. En orange l'interphase, ou phase de croissance somatique, est ponctuée par la réplication de l'ADN.

Le cycle cellulaire est une séquence d'étapes à sens unique que la cellule doit franchir avant de se diviser. La phase de mitose, en bleu dans la Figure 10, fut la première à être discrétisée du reste du cycle. Chez les eucaryotes, elle se caractérise par la disparition de la membrane nucléaire, particularité observable en microscopie. Le reste du temps, la cellule ne semble que 'grossir', on parle d'interphase (en orange dans la Figure 10). La réplication de l'ADN est restreinte à une période particulière de l'interphase, nommée 'S' pour synthèse (Howard & Pelc 51). Les deux phases résiduelles séparant les

phases M et S sont appelées G1 et G2 pour '*gap*', dans le sens d'intervalles séparant deux évènements discrets. Si la réplication de l'ADN se déroule au sein d'une phase particulière chez les microalgues eucaryotes (exceptions *Cf.* Karentz 1983), elle est découplée du cycle cellulaire chez les procaryotes (Vaulot 1994).

Au cours d'un cycle type, la principale période de croissance des autotrophes planctoniques est la phase G1, et les processus de division opèrent de nuit (Prezelin 1992, Berdalet 1992, Kromkamp & Claquin 2005). Dans la plupart des cas, la phase G2 est assez courte, sauf chez certaines espèces de dinoflagellé (Cetta & Anderson 1990).

3.2. Impact du cycle cellulaire sur la croissance et l'absorption

Le cycle cellulaire est donc, par définition, à l'origine de la planification de la division cellulaire et de la réplication de l'ADN. Cependant, ses interactions avec les métabolismes du carbone et de l'azote ne sont que partiellement connues. La principale difficulté réside dans la dépendance du cycle cellulaire au cycle lumineux diurne, qui l'entraîne sur sa propre fréquence et rend difficile la distinction des deux effets.

Gerath et Chisholm (1989) démontrent chez le dinoflagellé *Amphidinium carteri* que l'activité photosynthétique diurne est indépendante du cycle cellulaire, et seulement liée à l'alternance entre le jour et la nuit. Pourtant, Claquin *et al.* (2004) notent une capacité photosynthétique supérieure en G1 chez la diatomée *Cylindrotheca fusiformis*. Pour leur part, Bruyant *et al.* (2005) suggèrent que la capacité photosynthétique est à la fois une fonction de la lumière (photoacclimatation) et du cycle cellulaire. En particulier, la division cellulaire semble avoir un impact négatif sur la photosynthèse. D'autres aspects du métabolisme du carbone sont reliés au cycle cellulaire, comme la synthèse de lipides et de cellulose (Kwok & Wong 2005 chez *Cryptocodinium cohnii*).

L'impact du cycle sur le métabolisme de l'azote, et particulièrement sur son acquisition, est particulièrement peu documenté. Toutefois, Pawlowski (2004) suggère un effet de la division sur l'absorption de nitrate. En simulant de façon lagrangienne les conditions d'une couche de mélange profonde, il expose une population de *Thalassiosira weissflogii* à des cycles de 12h d'éclairement tous les 3 jours (Figure 11). Comme dans un cycle lumineux diurne, l'absorption d'azote est forte lors de la phase de jour puis diminue fortement au crépuscule, alors que la majeure partie de la population se divise, puis reprend après plusieurs heures alors que la population n'est pas éclairée (Figure 11, jours 29 et 30). De plus, Hildebrand & Dahlin (2000) notent un lien non linéaire entre le cycle lumineux et l'absorption de nitrates dans les données de Raimbault & Mingazzini (87) avec *Pheodactylum tricornutum*, de Smith *et al.* (92) avec *Skeletonema costatum*, et de Berges *et al.* (1995) avec *Thalassiosira pseudonana*. Ils expliquent ces déviations par **la régulation de l'expression du gène codant pour les transporteurs de nitrates, variable au cours du cycle cellulaire**. Les ARNm correspondant sont abondant en début de G1, puis leur nombre diminue ensuite, réaugmente en début de phase S et finalement chute en fin de phase G2/M. Les auteurs notent ainsi que l'hypothèse d'une acquisition continue d'azote au cours du cycle est erronée, et qu'elle peut fausser l'estimation de sa cinétique.

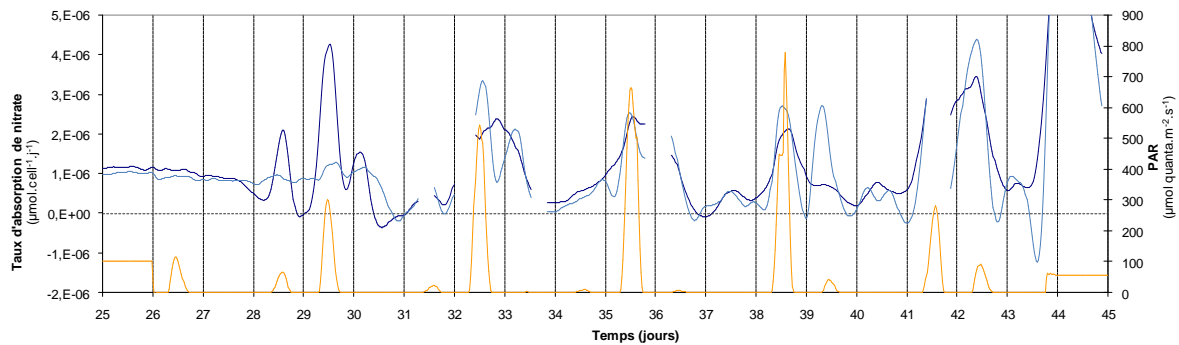


Figure 11. Réponse du taux d'absorption de nitrate de *Thalassiosira weissflogii* à un signal de lumière simulant une couche de mélange. Données de Pawlowski 2004. Les deux courbes bleues correspondent à deux réplicats de culture et le signal de lumière est en orange.

3.3. Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est jalonné de points de contrôle (*checkpoints*) régulant son avancement en fonction du statut physiologique de la cellule. Une telle organisation assure que les conditions sont requises à la division cellulaire (réplication de l'ADN correcte, fuseau mitotique formé, biomasse et énergie suffisante) et permet ainsi de conserver l'intégrité du patrimoine génétique et la viabilité des cellules (Vaulot 1994). La machinerie moléculaire de régulation est détaillée dans l'Encadré 2.

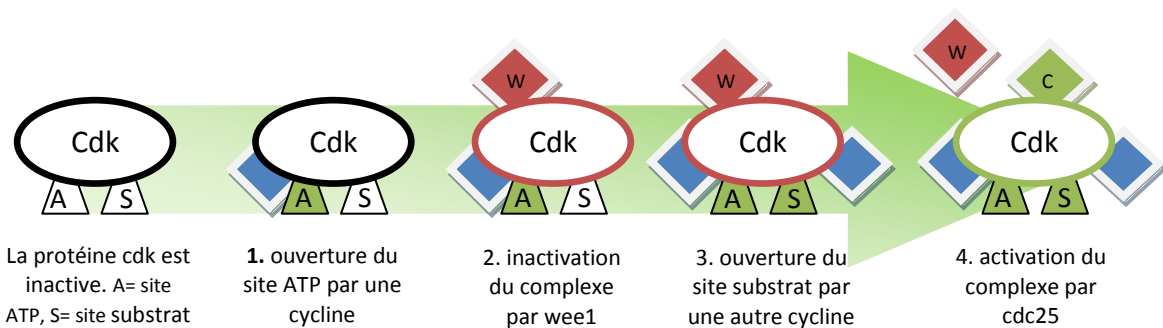
Par leur effet sur le statut physiologique, les conditions environnementales ont un impact sur le passage d'une phase à l'autre du cycle. La fraction de cellules en phase G1 augmente lors d'une limitation en azote jusqu'au blocage de la population entière dans cette phase lors d'une carence totale (Chisholm *et al* 1986, Olson *et al.* 1986). La lumière affecte également l'avancement de la phase G1 chez toutes les microalgues (Spudich & Sager 1980, Heath & Spencer 1985, Zachleder & Van den Ende 1992) et celle de la phase G2 chez certaines diatomées et cyanobactéries (Vaulot 1994). De plus, un point de contrôle sur la silice a été mis en évidence en G2 par le blocage dans cette phase d'une population carencée en silice (Brzezinski *et al.* 1990, chez *Thalassiosira weissflogii*). Enfin, la température a un effet non sélectif sur le cycle en affectant globalement toutes les réactions biochimiques. Nous discuterons dans le paragraphe suivant de la possible implication d'une horloge interne dans la régulation du cycle cellulaire.

Encadré 2. Machinerie moléculaire de régulation du cycle cellulaire.

La machinerie moléculaire qui régule l'avancement du cycle cellulaire est étonnamment conservée à travers les eucaryotes. Des levures jusqu'à l'Homme, deux structures protéiques complémentaires sont impliquées. Les **Cdk** (cycline dependent kinase) activent par phosphorylation un substrat ayant un rôle dans l'avancement du cycle. Leur propre activation est dépendante d'autres protéines dont la concentration varie au cours du cycle : les **cyclines**.

Les Cdk possèdent deux sites de liaison à d'autres molécules. L'un est dédié au substrat à phosphoryler et l'autre à l'ATP qui cédera un P au substrat. L'ouverture de ces sites est dépendante de la présence de certaines cyclines. Prenons l'exemple du passage entre les phases G2 et M. Une première cycline se lie à une Cdk afin d'ouvrir le site ATP (« 1 » sur la figure ci-dessous) mais le complexe est immédiatement inactivé par la kinase Wee1 (« 2 »). L'ouverture du site substrat n'est possible qu'en présence d'une autre cycline (« 3 »). Enfin, cdc25 désphosphoryle le complexe cycline/Cdk au même site que Wee1 et permet ainsi au Cdk d'accueillir l'ATP (« 4 », le complexe est 'activé'). Ce dernier phosphoryle le substrat en cédant son P^γ.

Il y a donc compétition entre Wee1 et Cdc25, respectivement inhibiteurs et activateurs du Cdk. La concentration de ces protéines est régulée au cours du cycle par un contrôle transcriptionnel de leur gène en fonction des conditions de croissance (Dunlap 1999, Sommers 1999, Vaultot 1994).



4. Le rythme circadien endogène

4.1. Notion d'horloge interne

Les organismes photosynthétiques dépendant directement de la lumière du jour, l'adaptation aux variations diurnes du flux de photons a dû constituer une forte pression de sélection. L'empreinte du cycle lumineux diurne se manifeste dans la cellule photosynthétique par l'existence d'un rythme endogène (ou rythme circadien, horloge interne) qui permet, par exemple, d'anticiper le levé du jour en préparant l'appareil photosynthétique à recevoir des photons. Sa période propre est d'environ 24h, elle peut dériver sous illumination continue mais est restaurée à 24h par cycle diurne normal (Edmunds & Funch 1969, Rivkin & Putt 1987, Lakin-Thomas 2006). La machinerie moléculaire est expliquée en Encadré 3.

Cette horloge planifie différents processus dans la cellule, et l'organisme tout entier dans le cas des organismes multicellulaires : de l'expression de certains gènes au phototropisme en passant par la division cellulaire, la bioluminescence, l'activité photosynthétique, la respiration, l'orientation, la synthèse et la migration de certains composés ou encore la sensibilité aux UV (Sweeney 1987, Hastings 1991, Johnson *et al.* 1998, Johnson 2001, Mittag 2001, Suzuki et Jonhson 2001).

4.2. Origine évolutive

Une horloge interne a pu être mise en évidence chez des cyanobactéries comme *Synechococcus*, présentes depuis 3,5 Ga à la surface de la Terre. Selon l'hypothèse « **escape from light** » (Pittendrigh 1993), une forte pression de sélection a dû imposer l'existence d'un oscillateur interne au sein des espèces. Pittendrigh suggère l'avantage évolutif offert aux organismes ayant transféré, la nuit, des processus sensibles au rayonnement solaire (la réplication de l'ADN et la division cellulaire sont sensibles au rayonnement ultraviolet). Chez les diazotrophes, la fixation de diazote ne peut se réaliser en même temps que la photosynthèse, elle montre également un cycle journalier perdurant en lumière constante (Chen *et al.* 1996).

Une autre hypothèse, « **the early bird gets the worm** » (McClung 2000), met en avant l'avantage d'anticiper les conditions de croissance. L'anticipation de l'aube et du crépuscule est démontrée sur l'expression de gènes orchestrant diverses voies métaboliques, notamment la photosynthèse (Harmer *et al.* 2000). De même, une persistance de l'activité photosynthétique sous illumination continue est mise en évidence chez des microalgues comme *Euglena* (Walter & Edmunds 1973), *Lingulodinium polyedrum* (Hastings *et al.* 1991) et chez des procaryotes phototrophes.

Encadré 3. Machinerie moléculaire de l'oscillateur interne.

Le mécanisme global de ce rythme endogène peut être schématisé par le modèle TTO (Transcription/Transition oscillator). La synthèse d'un élément A provoque l'expression d'un gène codant pour un élément B (Figure 12). En retour, l'élément B régule négativement l'expression de A et est à la base d'une des réactions effectrices citées ci-dessus. Ainsi, A et B sont autorégulés, l'un prenant le pas sur l'autre alternativement au cours de la journée (Lakin-Thomas 2006). La fréquence de ce mécanisme oscillatoire, ou boucle de rétroaction, se synchronise sur un signal forçant (en allemand 'zeitgeber', Figure 13) qui se trouve être dans la plupart des cas le cycle lumineux diurne (Edmunds & French 1969, Rivkin & Putt 1987, Fig. 3). La division cellulaire, entraînant la désintégration de l'enveloppe nucléaire, peut entretenir le rythme en libérant des substances jusqu'alors isolées dans l'un ou l'autre des compartiments cellulaires (Kondo et al. 1997). Ce rythme peut être perdu en éclairage constant, sous lumière vive ou lors du passage de certaines algues mixotrophes en milieu organique.

Chez les eucaryotes, l'horloge interne responsable du cycle circadien est codée génétiquement de façon relativement ubiquiste dans un jeu de gènes « Per » (pour periodicity) (Takahashi 1992). La transduction du signal se fait comme pour le cycle cellulaire par la voie kinase-phosphatase (Conoli et al. 1996). Différents mutants « per » ont été isolés montrant comme phénotypes des cycles de 18 à 28h. Chez les cyanobactéries, le rythme circadien de l'expression des gènes apparaît encore plus ubiquitaire. Un grand nombre de mutants de *Synechococcus elongatus* (>100) ont été isolés ayant des phénotypes différents tels qu'arythmies ou périodes altérées de 14 à 60h (Kondo et al. 1994). Une partie de ces mutants retrouvent un phénotype normal avec introduction d'ADN sauvage. Le centre de régulation semble être composé de 3 régions adjacentes (kaiA, kaiB, kaiC) dont l'abondance des différents ARNm (a, b, c) est rythmée dans la journée (Suzuki & Johnson 2001).

La régulation de l'expression des gènes peut s'opérer à deux niveaux. Le plus fréquent opère au niveau de la transcription du gène, on parle de contrôle transcriptionnel. Dans ce cas, la concentration en ARNm formés varie au cours du cycle circadien sans pour autant causer de variation au niveau de la protéine codée. Ce contrôle est utile dans le turn-over de protéines (remplacement de protéines en anticipation d'une dégradation). Le contrôle traductionnel, ou post transcriptionnel agit sur la traduction ou la durée de vie des ARNm. La concentration en composés utiles varie dans la journée (composés bioluminescents p. ex., McClung 2000, Mittag et al. 1998) sans que la quantité d'ARNm, et donc sans que l'expression du gène en amont ait à varier.

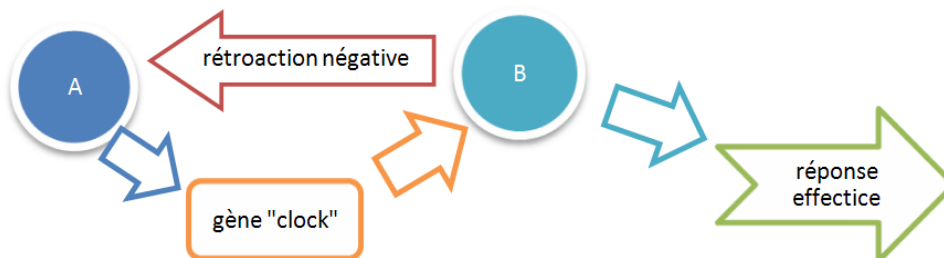


Figure 12. Mécanisme de l'oscillateur interne, d'après Lakin-Thomas (2006). La synthèse d'un composé A entraîne l'expression d'un gène 'clock' codant pour un composé B qui sera à la base d'une réponse effectrice et d'une rétroaction négative sur l'expression de A.

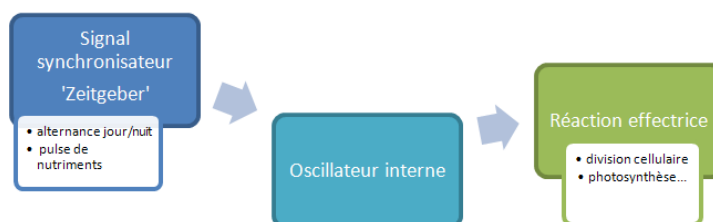


Figure 13. Mécanisme général de l'horloge interne. Un oscillateur moléculaire interne est synchronisé par un signal forçant et synchronise lui-même une réaction effectrice dans la cellule.

5. Suivre une cellule au niveau de la population : la synchronisation

5.1. Comment se synchronise une population

Puisque les conditions environnementales régulent l'avancement du cycle cellulaire, un signal variable de lumière ou de disponibilité en nutriments peut causer l'arrêt temporaire du cycle cellulaire. Prenons l'exemple du cycle lumineux diurne. Puisque le passage entre G1 et S dépend de la dose de lumière, les cellules se bloquent généralement en G1 la nuit (Figure 17). Ce phénomène synchronise les cellules entre elles, puisqu'au levé du jour elles reprendront toutes leur avancement en G1, où elles s'y bloqueront à nouveau la nuit suivante.

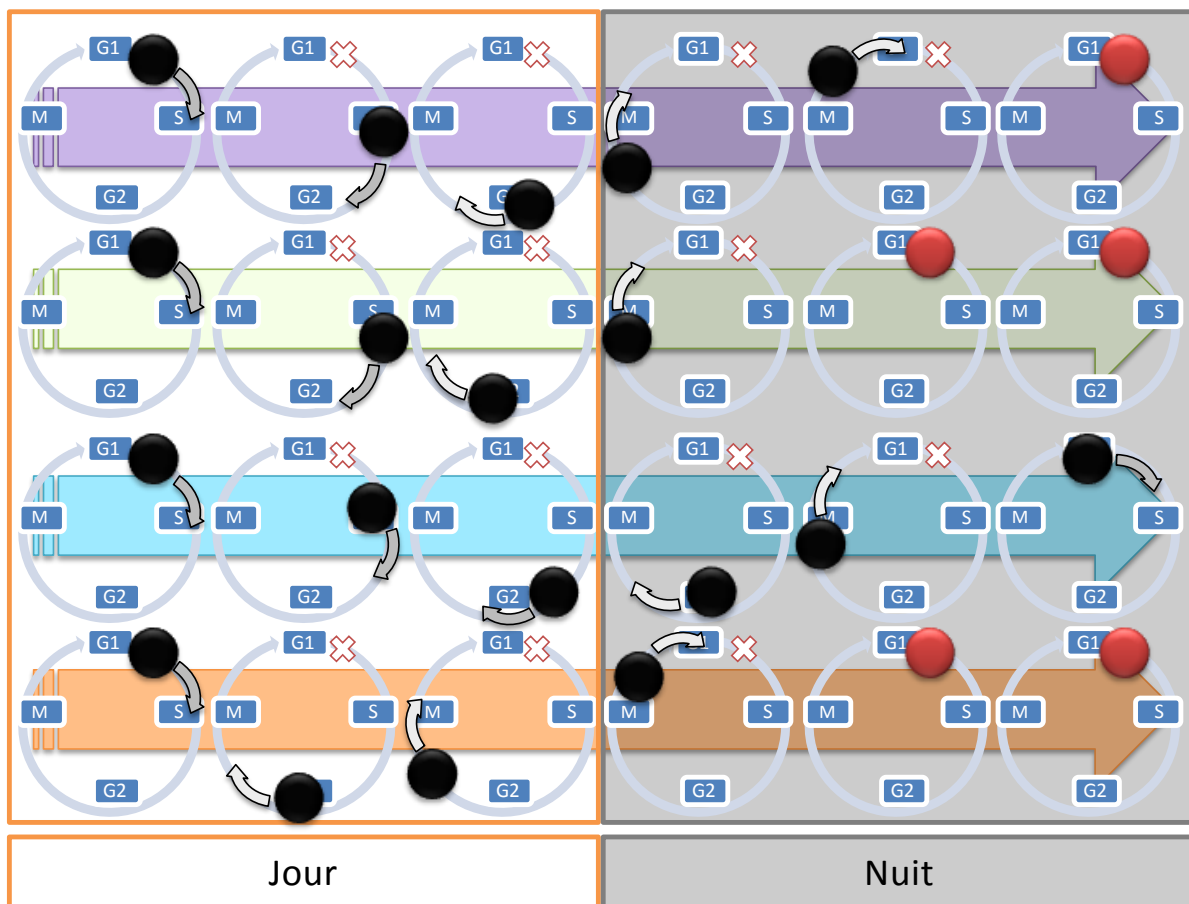


Figure 14. Phénomène de synchronisation sur signal lumineux fluctuant représenté par le blocage du cycle cellulaire en G1 au cours de la nuit. Chaque ligne représente l'avancement du cycle d'une cellule sur 24h. Le point représente la position de la cellule dans son cycle, il est rouge quand l'avancement est bloqué. De jour, le cycle de chaque cellule avance différemment selon l'hypothèse de la variabilité interindividuelle. De nuit les cycles s'arrêtent au point de blocage sur la lumière en G1 (croix rouge) et repartent ensemble au retour de la lumière.

5.2. La synchronisation en milieu naturel

Les premières divisions synchrones en océan ouvert furent rapportées sur *Ceratium* par Gough en 1905 (cité par Smayda 1975). Sur la verticale, Vaultot & Marie (1999) notèrent une synchronisation des populations de picoplancton dans l'océan Pacifique équatorial avec un décalage temporel de quelques heures entre *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et les picoeukaryotes. A profondeur fixe, les *Chlorophyceae* et les *Euglenophyceae* se divisent généralement au crépuscule ou de nuit, cependant les diatomées montrent des pics de division de jour comme de nuit (Paasche 1968, Enright 1969, Sournia 1974, Smayda 1975, Williamson 1980).

En conditions nutritionnelles non limitantes, le cycle cellulaire se bloque en G1 en l'absence prolongée de lumière. Une limitation par l'azote ajoute un autre point de blocage dans le cycle, que les cellules franchissent plus ou moins vite en fonction de leurs caractéristiques propres.

De plus, les conditions de croissance en milieu marin sont hautement variables. En surface, le signal lumineux se rapproche d'une sinusoïde tronquée de période 24h. A cause de l'hétérogénéité des conditions dans la colonne d'eau (atténuation lumineuse, patch de nutriments), la trajectoire de la cellule doit être prise en compte. Au final, chaque cellule est exposée à un signal lumineux différent qui peut être à l'origine d'une désynchronisation, au moins partielle, de la population (Kroon *et al.* 1992).

D'autres phénomènes plus singuliers peuvent affecter la synchronisation d'une population, à l'exemple du broutage préférentiel du zooplancton sur les grosses particules. Ce phénomène particulier interfère avec le cycle cellulaire en faisant disparaître les organismes les plus gros, et donc les plus avancés dans leur cycle (Williamson 1980).

5.3. La synchronisation au laboratoire

En culture, la synchronisation d'une population à partir d'un signal fluctuant permet de travailler dans des conditions proches du milieu naturel. Il peut cependant être utile de recourir à des inhibiteurs de croissance, spécifiques d'une phase du cycle. L'idée n'est plus de suivre l'effet des conditions de croissance sur le cycle mais l'effet de chaque phase sur la croissance.

Le nocodazole est un agent chimique empêchant la polymérisation des microtubules nécessaires, au cours de la mitose, à la séparation des deux jeux d'ADN. Il interrompt le cycle cellulaire en phase M, son action est réversible (Ng *et al.* 2006). L'hydroxyurée et l'aphidicoline inhibent respectivement la ribonucléotide réductase et l'ADN polymérase, nécessaires à la formation

d'ADN. Ils bloquent donc l'entrée en S du cycle, les cellules restent en G1. Enfin, la génistéine et la camptothécine inhibent les ADN topoisomérases nécessaires pour recombinaison l'ADN avant la division (Garrett & Grisham 2000). Ils bloquent donc le cycle cellulaire en G2.

En utilisant du nocodazole et de l'aphidicoline, Claquin *et al.* (2004) montrèrent que la capacité photosynthétique de *Cylindrotheca fusiformis*, une diatomée, était maximale en G1. Vaultot *et al.* (1986) utilisèrent l'hydroxyurée pour tester la sensibilité des phases G1 et G2 à l'éclairement.

Chapitre II

Matériels & Méthodes



II. Matériels et Méthodes

1. Représenter l'environnement au laboratoire

1.1. De l'océan au laboratoire

La variabilité des conditions environnementales en milieu marin est peu propice à l'étude expérimentale de leurs effets sur la croissance phytoplanctonique. La disponibilité en nutriments et lumière, et la température sont des forçages pouvant varier conjointement dans le temps et l'espace (Figure 18). Il est difficile dans ces conditions de constante variabilité, d'appréhender les effets de chaque élément sur le métabolisme. En outre, les faibles concentrations en nutriments du milieu marin conduisent à de faibles densités d'individus, ce qui nécessite le prélèvement de gros volumes. Enfin, l'approche *in situ* est compliquée par les coûts et les nombreux imprévus jalonnant les missions océanographiques. Le biologiste marin tentera donc de *représenter* l'écosystème dans le souci de *contrôler* un maximum de variables forçantes pour isoler leurs effets individuels sur le métabolisme.

Une première approche réductrice consiste à limiter et isoler la zone d'étude dans des mésocosmes *in situ* (Figure 18). Il devient possible de suivre, par exemple l'effet d'un ajout de nutriments traces ou de polluants sur une communauté naturelle (Agusti *et al.* 2009). L'aboutissement du processus réducteur amène au laboratoire. Les biologistes y étudient des processus particuliers, comme l'effet de la lumière sur la croissance d'une population monospécifique. Le recoupement d'informations parcellaires fera émerger une vision générale du fonctionnement de l'écosystème.

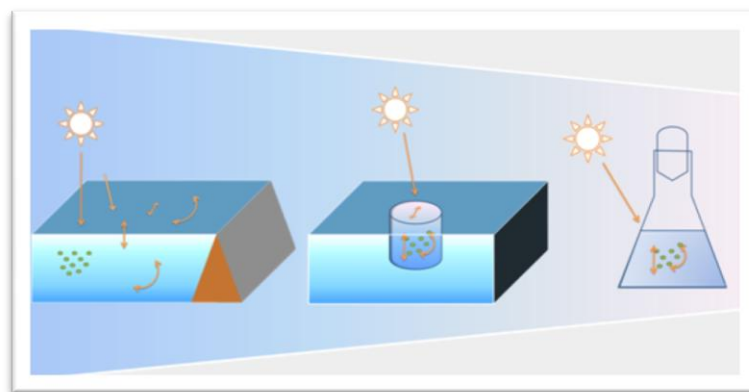


Figure 15. Echelles d'étude du phytoplancton : de l'océan au laboratoire. Diminuer l'échelle spatiale permet de mieux contrôler le milieu mais sort l'objet d'étude de son écosystème.

1.2. De la culture en batch à la culture continue

La culture en milieu fermé non renouvelé, autrement appelée *batch*, se développe dans un milieu en constante variation (Figure 16 haut). Le taux de croissance est dans un premier temps faible, reflétant une période de latence (*lag phase*) liée au transfert de la souche dans un nouveau milieu. Cette phase est d'autant plus courte que la culture est acclimatée. Suit la période de croissance exponentielle pendant laquelle la culture n'est pas limitée par les nutriments. En fin de phase exponentielle, les conditions se rapprochent du milieu océanique : un élément du milieu commence à devenir limitant et le taux de croissance diminue. Lorsque l'élément limitant a disparu du milieu, la croissance s'effectue sur les réserves intracellulaires de cet élément pendant un certain temps. Enfin, lorsque le quota interne est totalement épuisé la croissance est nulle et la biomasse se maintient à un plateau jusqu'à la mort des cellules (Figure 16 haut). Le confinement de la culture provoque également l'accumulation des produits de l'excrétion dans le milieu, ceux-ci pouvant devenir toxiques (Le Floch 2002).

Afin de maintenir la croissance de la population, il est possible de repiquer régulièrement la culture dans un milieu frais, on parle de culture semi-continue (Figure 16 centre). Cependant, cette technique engendre une variation périodique des conditions de croissance qui peut synchroniser la population contre la volonté de l'expérimentateur.

L'idéal est donc de renouveler en continu le milieu de culture. Ces cultures permettent de conserver les cellules en phase exponentielle dans des conditions stables sur une longue durée (Figure 16 bas). Le principe fut inventé par Monod (50) et Novick et Svirard (50) pour l'étude de la croissance bactérienne. Fijumoto *et al.* (56) semblent être les premiers à l'avoir utilisé pour étudier le phytoplancton. Les cellules sont cultivées dans une enceinte scellée n'autorisant aucun échange direct non contrôlé avec l'extérieur, on parle de **bioréacteur**. Le milieu est renouvelé en continu et le volume est maintenu constant grâce à un flux entrant égal au flux sortant. Plusieurs types d'utilisations sont possibles :

- en **turbidostat**, une mesure réalisée dans le bioréacteur sert à contrôler une variable d'état du système. Ici, la mesure du *taux de croissance* sert à réguler le *taux de dilution* afin de maintenir un *taux de croissance maximum*.

- en **chemostat** (CHEMical STATic environnement), le taux de dilution est fixé par l'expérimentateur à une valeur inférieure au taux de croissance maximum. Le milieu n'est donc plus suffisamment renouvelé pour soutenir la croissance de la population, un des éléments nutritifs devient limitant. Le taux de croissance de la population s'ajuste sur le taux de division.

Enfin, le **cyclostat** est une utilisation particulière des deux modes précédents dans lequel une condition nutritionnelle ou lumineuse est cyclique. L'exposition d'une culture à un cycle lumineux diurne est un exemple de cyclostat.

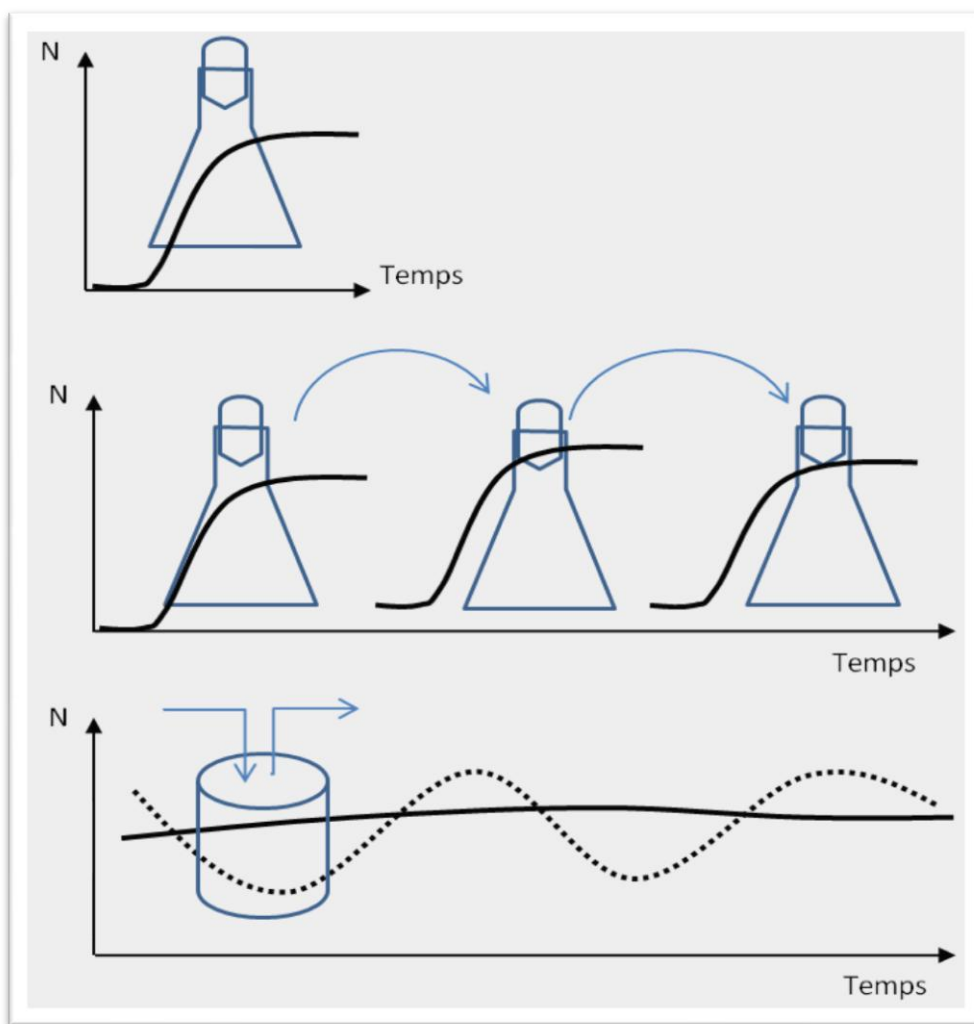


Figure 16. Différents mode de culture de micro-organismes : de la culture confinée à la culture continue.

Les courbes noires représentent la variation d'un descripteur (ex : le nombre de cellules). En haut, culture en batch : les conditions sont constamment variables et l'échelle de temps est de l'ordre de la semaine. Au milieu, culture semi continue : le milieu est régulièrement renouvelé, les conditions sont toujours variables mais se prêtent à des études plus longues. En bas, culture continue : le milieu est renouvelé en permanence, les conditions peuvent être stabilisées sur plusieurs mois (ligne pleine : forçage constant, ligne pointillée : forçage cyclique).

La culture en bioréacteur, si elle respecte des conditions d'application strictes, permet de représenter l'évolution des variables chimiques et biologiques à partir d'un jeu d'équations différentielles (Équations 3). La croissance des cellules doit être non limitée ou limitée par un seul facteur connu, et les variables doivent être homogènes dans l'enceinte expérimentale. Dans ce cas, la variation de la biomasse et du nombre de cellules résulte du gain par la croissance et de la perte par dilution. De plus, la variation du substrat dépend de l'équilibre apport/perte par dilution et de l'absorption.

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu X - DX = (\mu - D)X$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = DS_{in} - DS - \rho X = D(S_{in} - S) - \rho X$$

Équations 3. Equations de la biomasse et du substrat en bioréacteurs.

biomasse (X en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou en cell.L^{-1})

taux de croissance (μ en j^{-1})

taux de dilution (D en j^{-1}).

concentration en substrat (S en $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

taux d'absorption (ρ en $\mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

En mode turbidostat, trois situations sont possibles en fonction du taux de dilution. Si $D > \mu$, la population diminue (à droite de la Figure 17). Si $D = \mu$, la population se maintient, la croissance est équilibrée. Troisième cas, si $D < \mu$, la population augmente transitoirement avant d'atteindre un nouvel équilibre dans lequel un élément sera limitant à la croissance (à gauche de la Figure 17). Le comportement est analogue en mode chemostat, la limitation s'accroît si $D < \mu$, et au contraire elle diminue si $D > \mu$. Dans ce cas, le système se rapproche des conditions turbidostat. La biomasse à l'équilibre est déterminée par la concentration en élément limitant du milieu de renouvellement.

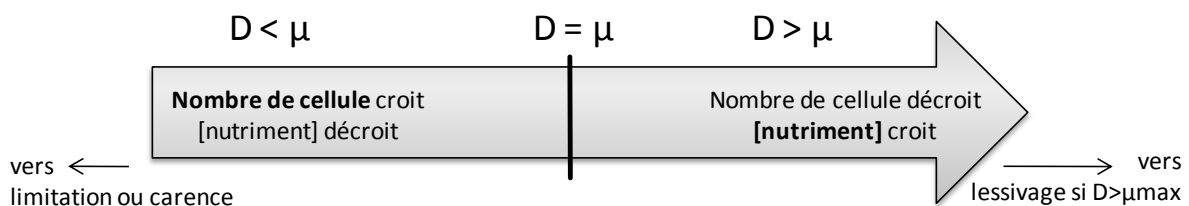


Figure 17. Evolution du nombre de cellule et de la concentration en nutriments en fonction du taux de dilution.

La culture en photobioréacteurs trouve des utilisations dans différents domaines. En physiologie, les propriétés cellulaires sont étudiées en suivant le comportement de la population. En modélisation, les données acquises permettent d'estimer certains paramètres et de valider les simulations (Pawłowski *et al.* 2002). En biologie évolutive, la constante sélection de la lignée la plus adaptée aux conditions de croissance permet d'étudier les pressions de sélection (Harder *et al.* 1977, Dykhuizen & Hartl 1983). En bioingénierie, les cultures continues permettent de produire des

substances d'intérêt telles que des acides aminés, des protéines et du biocarburant (Chaumont 1993, Borowitzka 1999, Cadoret & Bernard 2008). En aquaculture, les microalgues sont cultivées pour l'alimentation de larves de mollusques ou de crustacés (Borowitzka 1997). Anecdotiquement, ce type de culture est même envisagé pour recycler le dioxyde de carbone en oxygène dans les stations spatiales (Ganzer & Messerschmid 2009).

1.3. De l'équilibre au transitoire

La notion d'équilibre réfère à une condition où toutes les influences se compensent. Une croissance équilibrée (*balanced growth*) est donc une situation où tous les descripteurs évoluent de concert sans modifier les ratios élémentaires internes. Cependant, cet état d'équilibre n'est pas très représentatif du milieu marin, siège d'une grande variabilité des conditions environnementales. En effet, l'équilibre n'est obtenu qu'en réunissant une stabilité des conditions environnementales sur le temps et leur homogénéité dans l'espace. Or, les conditions de croissance en milieu marin sont variables sur le temps et l'espace. Néanmoins, la facilité de suivre un équilibre en culture continue a transformé une situation particulière en référence.

Dans nos expériences, nous suivrons l'effet des conditions environnementales sur la croissance à l'équilibre (Figure 18 haut) mais également l'évolution transitoire de cet équilibre lors d'une modification des conditions de croissance (lumière et azote) (Figure 18 bas).

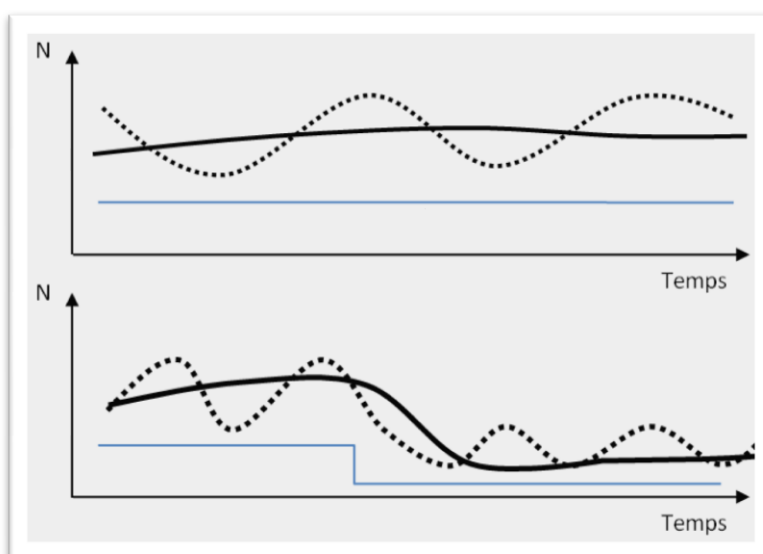


Figure 18. Les cultures en continu permettent de suivre des populations à l'équilibre (en haut) et de suivre l'évolution de cet équilibre en changeant les conditions environnementales (en bas). Les courbes noires représentent la variation d'un descripteur (ex : la quantité d'azote par cellule) et la courbe bleue celle d'une variable forçante (ex : le taux de dilution)

2. Contrôler les conditions de croissance au laboratoire

Le centre de notre dispositif expérimental est constitué d'un bioréacteur contenant la culture de microalgues. Les variables forçantes qui y sont contrôlées sont : lumière, température, pH et apports en azote dissous (Figure 19). Le dispositif expérimental de contrôle est détaillé dans ce chapitre, celui concernant les mesures le sera dans le suivant.

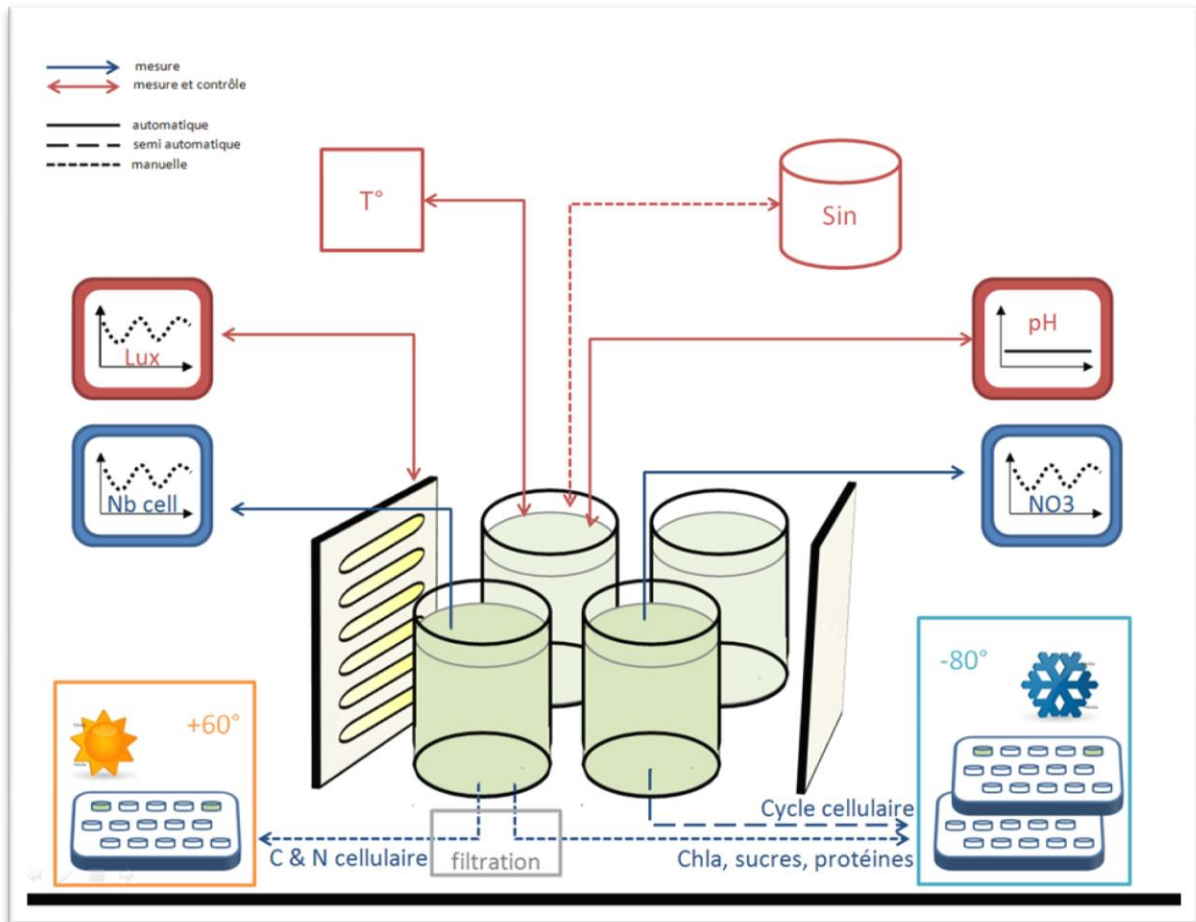


Figure 19. Dispositif expérimental. Les bioréacteurs sont encadrés par deux rampes d'éclairage. Les variables mesurées qui sont également contrôlées sont symbolisées par des flèches rouges doubles : lumière, pH, température, dilution et concentration en azote dans le milieu de renouvellement. Les variables mesurées mais non contrôlées sont représentées par des flèches bleues simples : lignes pleines = échantillonnage et mesure automatique (dénombrement cellulaire, concentration en nitrate dans les cultures), ligne à grand traits = mesures manuelles dont le prélèvement est automatique (cycle cellulaire) et lignes à petits traits = échantillonnage et mesure manuelles (contenu cellulaire en carbone, azote, chlorophylle a, glucides et protéines). Tous les échantillons sont conservés temporairement à l'azote liquide puis au congélateur à -80°C sauf ceux dédiés à l'analyse du contenu en carbone et azote cellulaire qui sont immédiatement placés à l'étuve à 60°C .

2.1. Contrôler l'intensité et le signal lumineux

Le flux de photons est délivré par deux rampes de six tubes fluorescents (Osram Dulux 55W) placées de part et d'autre du dispositif expérimental (Figure 19). L'ordinateur module l'intensité lumineuse en délivrant une tension variable de 0 à 10V, celle-ci est relayée par des cartes analogiques jusqu'à un ballast (Osram Quicktronic) situé au niveau des néons. Un algorithme permet de programmer le signal lumineux désiré à partir d'une équation ou d'un tableau de valeurs.

L'intensité lumineuse reçue au centre des bioréacteurs dépend de l'intensité de la source, de la disposition géométrique des bioréacteurs par rapport à la source, et de l'auto-ombrage induit par le développement de la culture elle-même. L'intensité lumineuse est mesurée en continu au centre des bioréacteurs et à l'extérieur par deux quantamètres sphériques 2π (Biospherical Instruments QSL-100 et QSL-2100).

2.2. Contrôler l'apport en nitrate

L'azote inorganique est apporté exclusivement sous forme de nitrates par renouvellement continu du milieu. Le nitrate est ajouté dans le milieu de renouvellement à la concentration de $200\mu\text{mol.L}^{-1}$, celle-ci est régulièrement contrôlée. La concentration résiduelle dans les bioréacteurs est mesurée en ligne de façon automatique (Cf. chapitre suivant). Des pompes péristaltiques (Gilson) créent les flux entrants et sortant du bioréacteur. Les débits sont vérifiés quotidiennement et ajustés dans le cas d'une dérive (causée par l'usure des tubes assurant le transport du fluide). Le milieu est délivré goutte à goutte par une canule en verre au dessus de la surface de la culture. Le volume est maintenu constant par une aspiration de la culture en sa surface avec un débit supérieur au débit d'entrée (la voie de sortie pompe donc alternativement de la culture et de l'air).

2.3. Contrôler l'apport en carbone dissous

La concentration en carbone inorganique dissous (DIC) est maintenue grâce à un bullage finement contrôlé de dioxyde de carbone dans les cultures. N'ayant pas la possibilité de mesurer en ligne le DIC dans les bioréacteurs, les ajouts de CO_2 sont réalisés en fonction de l'évolution du pH, mesuré en continu dans les cultures. Nous choisissons de maintenir le pH à une valeur de 8,0 pour laquelle la concentration en DIC avoisine les $1,8\text{mmol.L}^{-1}$. De jour, la fixation photosynthétique de CO_2 conduit à une augmentation du pH ; le dispositif bulle donc du CO_2 dans les cultures pour le maintenir à sa valeur de référence. La nuit, la respiration produisant du CO_2 , le pH a pu descendre

légèrement au dessous de 8,0. (Figure 20). Les bioréacteurs étant scellés, l'évacuation des gaz s'effectue à travers un filtre à air (Hepa-Vent).

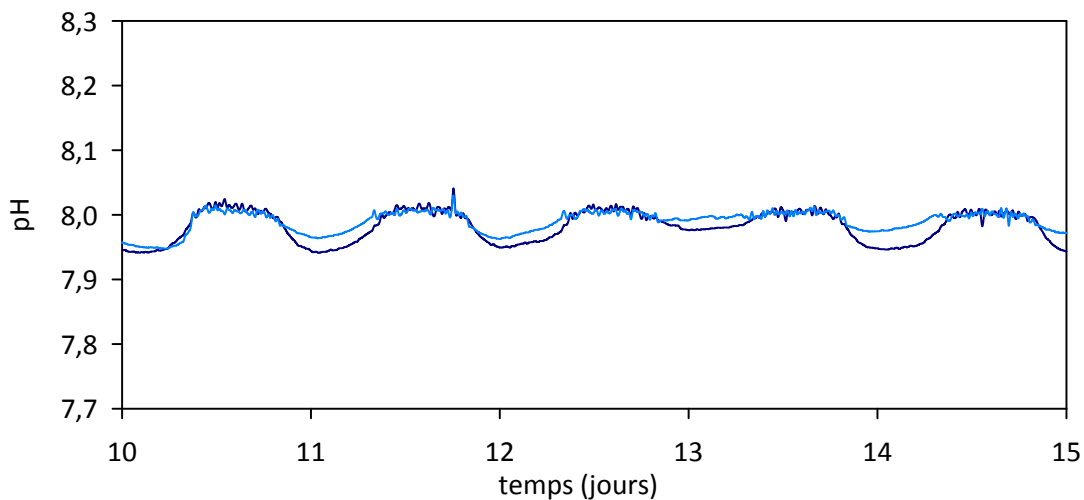


Figure 20. Evolution du pH au cours de 5 jours pendant l'expérience *témoin*.

2.4. Contrôler la température

Les sources de lumière sont très proches des bioréacteurs et dégagent une chaleur non négligeable. Afin de garder une température constante, les cultures sont isolées de l'extérieur par une double paroi en verre dans laquelle circule un liquide thermostaté à $22,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ par un cryostat. De plus, la température ambiante du laboratoire est climatisée à 20°C .

2.5. Contrôler l'absence de contamination

Bien que nous ne visions pas à l'axénicité totale des cultures, un maximum de précautions est pris dès le montage des bioréacteurs et pendant toute la durée de l'expérience afin d'éviter le développement de micro-organismes autres que *Thalassiosira weissflogii*.

Lors du montage, les bioréacteurs sont lavés à l'acide puis à l'éthanol avant d'être rincés par le milieu de culture préalablement autoclavé et filtré. Toute la tubulure servant ensuite au transport des fluides est également stérilisée. Les bioréacteurs sont clos après remplissage de l'acide, et les échanges de fluides s'opèrent ensuite via la tubulure stérile.

Au cours de l'expérience, le milieu de renouvellement préalablement autoclavé est à nouveau filtré sur $0,22\mu\text{m}$ avant de parvenir au bioréacteur. Un clapet anti retour prévient la contamination du milieu de renouvellement à partir de la culture. Dans la plupart de nos

expériences, les forts taux de dilution imposés ($1 \text{ à } 2\text{j}^{-1}$) et l'absence de limitation en nitrate ne sont pas propices aux développements bactériens. Les suivis quotidiens au cytomètre en flux et compteur Coulter permettent de s'assurer de la non prolifération de micro-organismes. Enfin, le bilan d'azote (équation ci dessous) est vérifié afin de s'assurer de la cohérence entre l'azote entrant (S_{in}) et l'azote mesuré dans le bioréacteur à tout instant, c'est-à-dire la somme de la concentration en nitrate dans la culture (S) et de l'azote dans la cellule (N). Toute perte d'azote serait le signe d'une compétition sur le substrat entre populations phytoplanctoniques et bactériennes.

$$\frac{S + N}{S_{in}} = 1$$

2.6. Homogénéiser la culture

Du à l'auto-ombrage des cellules, les conditions lumineuses ne sont pas homogènes dans le bioréacteur. Pour une intensité moyenne de $900\mu\text{molquanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ reçue au centre du bioréacteur et une population d'environ 10^8cell.L^{-1} , le flux de photons reçu au sein du bioréacteur présente un gradient de l'ordre de 5 à 10%. L'agitation à l'aide d'un barreau aimanté et le bullage d'air créent un mouvement continu assurant l'homogénéité de la culture sur une échelle de temps de la seconde. L'effet d'une variation de l'intensité lumineuse de cet ordre dans les photobioréacteurs est peu discuté. Par une approche numérique, Esposito *et al.* (2009) suggèrent toutefois un effet défavorable sur la croissance à cause du découplage temporel entre la variation du flux de photons et la réponse photophysologique du pool pigmentaire.

3. Mesurer le système

3.1. Calculer le volume de prélèvement maximal

Le nombre d'analyses effectuées requiert un volume échantillonné de culture non négligeable. La fréquence des prélèvements et le nombre de réplicats sont choisis en fonction du taux de renouvellement (D). D étant égal au rapport débit (d) sur volume (V), le volume maximum que l'on peut prélever dans le bioréacteur sans induire de réduction de volume sur 24 heures correspond à $V_{max} = D.V$. Dans certaines expériences conduites avec un faible taux de dilution, la fréquence de mesure et/ou le nombre de réplicats ont dû être réduits.

3.2. Mesurer le nombre de cellules

Le dénombrement cellulaire est assuré par un dispositif automatique constitué d'un

préleveur/diluteur et d'un compteur optique de particules (HIAC ROYCO 9700 Pacific Scientific Instruments, Encadré 4). Le principe optique repose sur la mesure de l'ombre projetée par les cellules lors de leur passage à travers un faisceau laser. Un logiciel dédié donne les résultats sous forme de spectre de taille distribué en 50 canaux entre 1,5 et 30 μ m. Les spectres de tailles sont le fruit de la moyenne de 3 mesures consécutives. Un examen visuel est opéré pour les mesures présentant un coefficient de variation supérieur à 3%.

3.3. Suivre le cycle cellulaire

Les échantillons dédiés à l'analyse du cycle cellulaire sont prélevés par un dispositif automatique créé au cours de la thèse (Encadré 5, Figure 23). L'appareillage comprend un jeu de pompes et d'électrovannes transportant la culture et la solution fixatrice jusqu'à des tubes à centrifugations (Eppendorf). Le mélange final est constitué de 10% de glutaraldéhyde préalablement dilué à 10% (concentration finale 1%). La deuxième partie du dispositif correspond à un plateau rotatif programmable contenant les tubes. Dans un délai de 8h suivant leur fixation, les échantillons sont transférés dans de l'azote liquide puis dans un congélateur à -80°C jusqu'à analyse.

Le cycle cellulaire (détaillé p36) comprend une phase particulière « S » au cours de laquelle la concentration en ADN par cellule double, c'est ce descripteur que nous suivons. L'ADN des cellules est marqué en ajoutant à 500 μ L de culture une solution de SYBR-Green I (SG1) à 5% pendant 15 min. Le cytomètre émet un faisceau laser à Argon (excitation à 488nm, modèle 163A1202 Spectraphysics USA) que chaque cellule absorbe, diffuse et diffracte en partie. Des capteurs mesurent ces différentes propriétés ainsi que la fluorescence émise à plusieurs longueurs d'onde. Des populations de cellules, par exemple *Thalassiosira weissflogii*, peuvent être différenciées les unes des autres grâce à ces différents descripteurs, reflétant la taille, la granularité et le contenu en chlorophylle (fluorescence naturelle dans le rouge). Le contenu en ADN par cellule est suivi grâce au marquage fluorescent du SG-1 dans le vert (émission à 520nm, Encadré 5, Figure 24). En G1, la population contient un jeu d'ADN, en S l'ADN se réplique et en G2 le contenu en ADN aura doublé, tout comme l'intensité de fluorescence dans le vert (Figure 9). La quantité d'ADN par cellule ne variant pas entre les phases G2 et M, nous ne pourrions les distinguer et parlerons de phase G2/M. Une routine développée en Matlab (Mathworks) permet d'extraire les fichiers de fluorescence du SG1 sous forme de nombre de cellules par canal de fluorescence (Encadré 5, Figure 25). Le programme permet également d'ajuster deux fonctions normales représentant les populations en G1 et G2/M. La phase S est déduite par soustraction des deux courbes du signal de fluorescence global.

Encadré 4. Etalonnage du HIAC et comparaison avec d'autres appareils de mesures.

Un étalonnage est réalisé avant les expériences avec des billes de calibrations de différentes tailles et les mesures du HIAC sont comparées à celles du cytomètre en flux (Becton Dickinson FACScalibur) et du compteur Coulter (Beckman Multisizer 3). Les résultats de cette comparaison sur une journée montrent un ratio fixe sur le temps de 0,93 entre les dénombrements mesurés par le Coulter et le HIAC (Figure 21). Les deux appareils mesurent de façon précise la taille des billes de références (Figure 22A) mais la mesure de la taille de *Thalassiosira weissflogii* est différente, et surtout la variation de la taille sur une journée n'est pas la même avec les deux appareils. Dans une expérience test où la population est faiblement synchronisée, la variation du diamètre moyen de la population mesuré au Coulter est très faible comparée à celle mesuré au HIAC (Figure 22B). D'autre part, la diminution de la taille localisée entre minuit et 6h ne correspond pas à l'augmentation du nombre de cellules observée entre 15h et 21h. La variation de la taille mesurée au HIAC est davantage corrélée au contenu cellulaire en azote, carbone, chlorophylle *a*, glucides et protéines. La variation de la taille mesurée au HIAC est davantage corrélée au contenu cellulaire en azote, carbone, chlorophylle *a*, glucides et protéines. Nous considérons que le HIAC n'est pas apte à mesurer précisément la taille de *Thalassiosira weissflogii*, mais qu'il convient à la mesure de son dénombrement.

Figure 21. Rapport entre les valeurs de concentrations mesurées avec les différents instruments (ordonnées) au cours de la journée (abscisses en heures). CC : Coulter, FC : cytomètre en flux, HC : HIAC

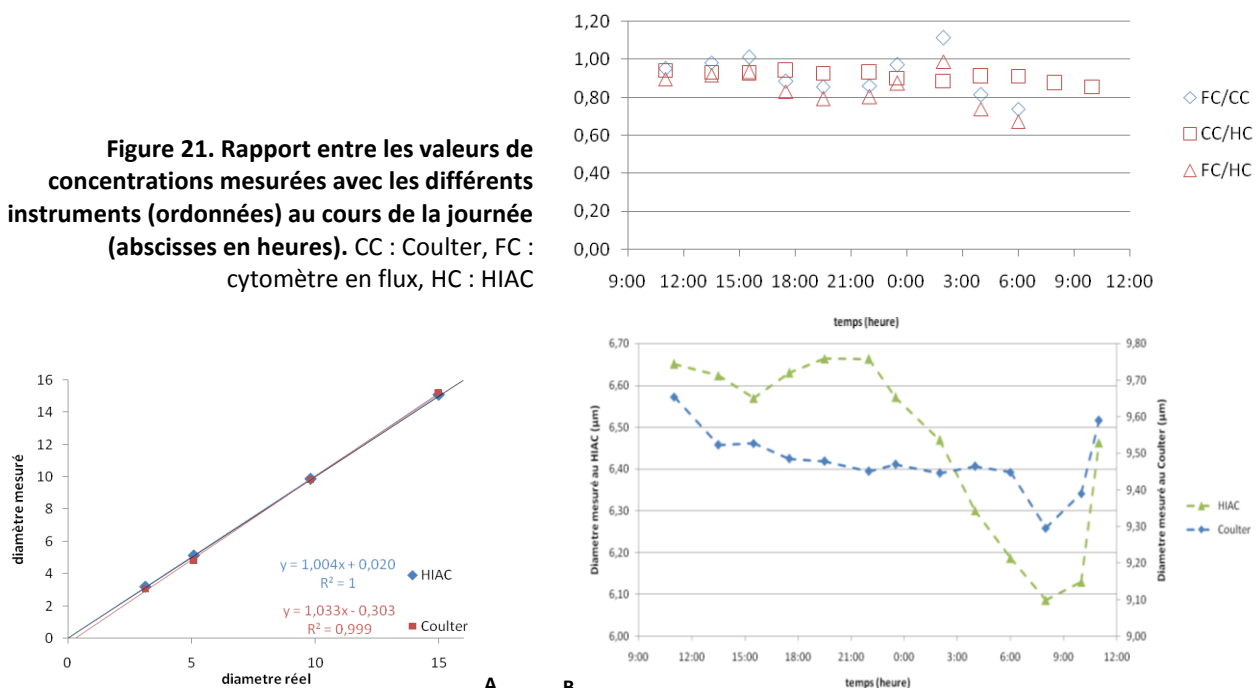


Figure 22. A. Comparaison du diamètre de billes de référence mesuré au HIAC (ordonnée) et au compteur Coulter (abscisses). B. Comparaison du diamètre moyen d'une population de *Thalassiosira weissflogii* faiblement synchronisée sur un cycle lumineux diurne (12:12, levé du jour à 8h).

Encadré 5. Semi automatisé de l'analyse du cycle cellulaire

Intégration d'un échantillonneur automatique dans le dispositif expérimental et adaptation en vue du suivi du cycle cellulaire

- élaboration du dispositif de prélèvement : plateau tournant, pompes, électrovannes, transport de fluides (Fig. 23A)
- choix et modification du matériel acheté pour accueillir un nombre optimal d'échantillons (Fig. 23B)
- élaboration du protocole de fixation des échantillons et test de la viabilité de la méthode
- élaboration du programme de contrôle par ordinateur (Amélie Gelay, IR CNRS)
- tests divers (vitesses, synchronisation entre les différents éléments, reproductibilité....)

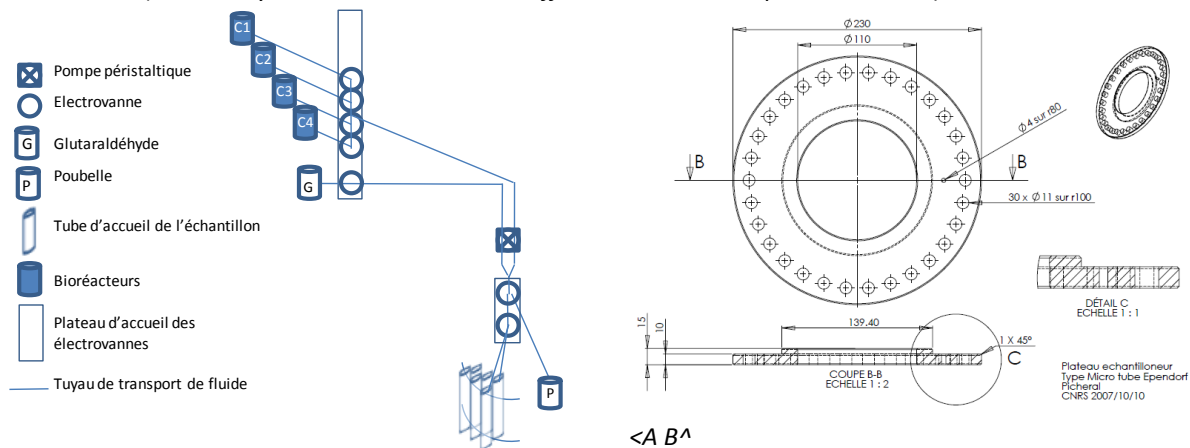
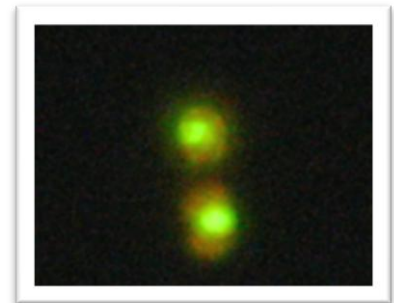


Figure 23. A. Dispositif d'échantillonnage et fixation automatique de culture pour analyse du cycle cellulaire. B. Exemple de développement : dessin technique du plateau d'accueil des tubes à centrifugations

Optimisation du protocole de marquage de l'ADN de *Thalassiosira weissflogii* pour suivi du cycle cellulaire

- choix du marqueur, la Fig. 24 montre le marquage du noyau par le Sybr-Green-I (SG1).
- tests sur le volume et le temps d'incubation.
- tests sur l'utilisation de perméabilisant de membrane et de RNase. Ces tests ont conclus dans notre cas à leur inutilité.

Figure 24. Observation au microscope à épifluorescence de cellules de *Thalassiosira weissflogii* marquées au SG1. En rouge : fluorescence naturelle de la Chla. En vert : fluorescence du SG1 marqueur de l'ADN.

Elaboration d'un programme de traitement du signal en routine

Un volume important de données a été accumulée et un programme de déconvolution des courbes de fluorescence a été élaboré. Il assure en routine l'extraction de l'information cible à partir des fichiers cytomètre, la déconvolution du signal G1, S et G2/M (Fig. 25) et l'enregistrement en base de données.

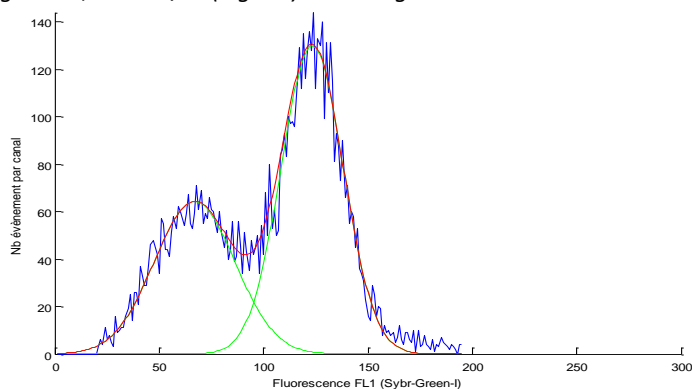


Figure 25. Résultat graphique de la déconvolution du signal de fluorescence SG1 montrant la répartition des cellules selon leur intensité de fluorescence en deux populations G1 (pic de gauche) et G2/M (pic de droite).

3.4. Mesurer l'azote inorganique dissous (nitrate et nitrite)

L'échantillonnage, la mesure et l'enregistrement des concentrations en nitrate et nitrite sont entièrement automatisés et intégrés au dispositif expérimental (Figure 19, Malara & Sciandra 1991). Les échantillons sont prélevés par un jeu de pompes et d'électrovannes, puis filtrés afin de retenir les particules, et injectés dans un auto-analyseur (Technicon). Dans un premier temps, le nitrite est mesuré par une réaction colorimétrique qui le transforme en un complexe diazoïque de couleur rose (Benshneider & Robinson 52). Ensuite, le nitrate est réduit en nitrite au sein d'une colonne cadmium/cuivre (Wood *et al.* 1967) et l'analyseur effectue une nouvelle mesure. Finalement, la concentration en nitrate est déduite de la différence entre les deux mesures. En amont, un dispositif automatique dilue la culture afin de permettre à la réaction colorimétrique de fournir un signal linéaire pour des teneurs en nitrate et nitrite inférieures à $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Cette contrainte nous a conduits à utiliser des concentrations de nitrate dans le milieu de renouvellement d'environ $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Des étalonnages permettent de vérifier l'efficacité de la colonne de réduction avant chaque expérience.

3.5. Mesurer les quotas cellulaires

3.5.1. Carbone et azote

Deux ou trois répliquats de 10mL de culture sont filtrés pour mesurer les concentrations en carbone et azote cellulaires. Les filtres (Whatman GF-C) sont préalablement calcinés à 500°C pendant 10h afin d'éliminer toute trace de matière organique puis, après filtration, stockés à l'étuve à 60° . L'analyse est réalisée par chromatographie des gaz (CO_2 et N_2) dégagés lors de la combustion de l'échantillon (PerkinElmer CHN Series 2 2400). Les coefficients de variations sont respectivement inférieurs à 3% et 5% pour les mesures de carbone et d'azote.

3.5.2. Chlorophylle a, glucides et protéines

Les mesures de quotas en chlorophylle a (Chla), glucides et protéines sont réalisées à partir de prélèvements manuels de 5 ou 10mL de culture en fonction de la densité cellulaire. Après filtration selon la méthode précédemment détaillée, les échantillons sont placés dans un bain d'azote liquide puis à -80°C jusqu'à analyse.

L'extraction de la Chla est réalisée dans un bain de diméthylsulfoxyde dilué à 3/2 dans de l'acétone pendant 15 minutes à l'obscurité. La fluorescence naturelle de la Chla contenue dans le surnageant est mesurée au fluorimètre (Turner design).

Les dosages de protéines et glucides sont basées sur des réactions colorimétriques. Les protéines sont extraites par sonication puis mise en réaction avec des solutions commerciales (kit Biorad DC Protein assay). Les glucides sont traités avec du phénol et de l'acide sulfurique concentré (Sun 1984). L'absorbance des complexes colorés est ensuite mesurée au spectrophotomètre. Les coefficients de variations sont de l'ordre de 2%, 4% et 6% respectivement pour la Chla, les glucides et les protéines.

4. Lisser, dériver et calculer

La fréquence d'acquisition des mesures de 0,5 à 2h⁻¹ permet de lisser et dériver les séries acquises afin de calculer des taux. Le lissage est un point important et sensible car il détermine l'échelle fractale du signal créé. En d'autres termes, la quantité d'information contenue dans le signal final dépend des paramètres du lissage. Leur choix devra donc faire l'objet d'une attention particulière afin d'éviter de perdre ou créer de l'information.

4.1. Que calcule-t-on à partir des mesures ?

Les mesures décrites précédemment nous permettent d'approcher toutes les variables des équations de la biomasse et du substrat en bioréacteur (Équations 3 p54), ce qui nous permet de calculer les taux de division et d'acquisition de matière.

Le taux de division est calculé en dérivant la série de dénombrement cellulaire (Tableau 1). Le signal de mitose est calculé à partir du pourcentage de cellules en phase G1. Ces deux signaux localisent les événements de divisions synchrones dans la population.

Le taux de fixation de carbone est calculé à partir de la variation des concentrations en carbone particulaire (Tableau 1). Le taux d'acquisition d'azote est calculé de deux manières : à partir de la variation (négative) de la concentration en azote inorganique dans la culture, et à partir de la variation (positive) de la concentration en azote dans la cellule (Tableau 1). La comparaison de ces deux estimations indépendantes permet de renforcer la robustesse des résultats. De légères différences ont pu être observées au cours des expériences, elles peuvent provenir 1) de l'excrétion d'azote sous d'autres formes que celles mesurées, ou de la présence d'une autre source d'azote

inorganique comme l'ammonium ou l'urée; 2) de la présence d'une autre forme d'azote particulière comme les bactéries ; 3) d'une perte de matière azotée lors de la filtration ; 4) de variations sous estimées de la teneur en nitrate si celle-ci était supérieure à la gamme pour laquelle la réaction colorimétrique est constante ou inférieure à la limite de détection de l'appareil, et 5) d'erreurs de mesure analytique. Nous avons tenté de limiter au maximum ces différents biais possibles en vérifiant le bilan en azote, en choisissant une souche résistante à la filtration (Cf. p67) et en faisant en sorte que la concentration de nitrates reste dans la gamme linéaire de la réaction colorimétrique.

Tableau 1. Equations de calcul des taux de division, d'acquisition d'azote et de fixation de carbone, ainsi que du signal de mitose.

Taux	Formule	
Taux de division	$\mu = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X} + D$	où X est la densité cellulaire ($.L^{-1}$) et D le taux de dilution ($.j^{-1}$)
Signal de mitose	$M_{signal} = \frac{dpG1}{dt} \frac{1}{pG1}$	où $pG1$ est le pourcentage de cellules en phase G1
Taux d'acquisition d'azote	$\rho_s = -\frac{d(S)}{dt} + D(S_{in} - S)$ $\rho_N = \frac{dN}{dt} \frac{1}{N} + D$	où S est la concentration en nitrate dans la culture ($\mu mol.L^{-1}$), S_{in} celle dans le milieu de renouvellement, N est la concentration en azote cellulaire et D est le taux de dilution ($.d^{-1}$)
Taux de fixation de carbone	$\rho_c = \frac{dC}{dt} \frac{1}{C} + D$	où C est la concentration en carbone cellulaire ($\mu mol.L^{-1}$) et D est le taux de dilution ($.j^{-1}$)

4.2. Choisir les méthodes numériques

Les méthodes numériques sont choisies en fonction des caractéristiques de chaque série de données (fréquence de mesure et bruit). Le principe général est de segmenter la série temporelle en morceaux afin d'ajuster sur chacun d'eux une fonction polynomiale, c'est la méthode des « *spline* ». L'intérêt majeur est que le degré de ces polynômes d'ajustement partiels sont plus faible que ceux d'une fonction ajustée à l'ensemble de la série. Cela réduit la création d'information, proportionnelle au nombre de nœuds (phénomène de Runge).

La méthode de lissage la plus fréquemment utilisée dans ce travail, dite '*Savitsky-Golay*' (Savitsky & Golay 1964), effectue une régression polynomiale locale pour calculer chaque point du lissage. Nous pouvons jouer sur le degré des polynômes et le niveau de segmentation de la série.

Cette technique conserve les maxima et minima de la série, ce que ne permet pas d'autres techniques comme la moyenne mobile. Au préalable, la série aura été interpolée afin d'obtenir un espacement homogène des points. L'autre méthode utilisée, dite '*cubic*', conserve l'essence de la précédente en divisant le jeu de donnée en segments pour ajuster localement des polynômes de degré trois. Les paramètres sont ajustés sur une partie des données et testés sur d'autres par cross-validation (Craven & Wahba, 1979). Contrairement à la méthode précédente, la courbe interpolée passe par tous les points de mesure. Cet avantage apparent peut créer des variations dans le signal lissé qui sont inexistantes dans le signal d'origine, ce qui est préjudiciable pour le calcul sa dérivée.

4.3. Évaluer la confiance

Puisque la quantité d'information contenue dans le signal dérivé dépend de la méthode de lissage, nous devons estimer au cas par cas la confiance à attribuer aux différentes informations, à défaut de trouver un estimateur numérique objectif. Nous devons particulièrement vérifier la vraisemblance des pics et leurs positions. Par exemple la Figure 26A montre que le taux de division peut présenter de 1 à 3 pics quotidiens, ce nombre dépend des paramètres choisis lors du lissage. Augmenter le nombre de nœuds diminuera l'écart entre les mesures et le signal lissé, mais augmentera le nombre de points d'inflexions et donc celui des pics dans le signal dérivé. Un compromis doit donc être trouvé, qui minimise les résidus tout en conservant la forme du signal originel. Estimer la significativité des pics engendrés lors du lissage suppose de vérifier si les oscillations observées sont reproduites dans le temps et dans les différents bioréacteurs répliqués, de prendre en compte le nombre de points impliqués dans la formation du pic, et finalement comparer les signaux qui peuvent l'être, comme les deux estimations du taux d'acquisition d'azote, ou comme le taux de division et le signal de mitose.

Par exemple, la Figure 26A suggère que le double pic du taux de division calculé le jour 18 (Figure 26C) pourrait être considéré comme suspect puisqu'il n'est dû qu'à un seul point de mesure. Dans le cas présent, le fait que le signal de mitose présente lui aussi un double pic (Figure 26B) corrobore le signal de division. A l'inverse, le pic du signal de mitose observé au milieu du jour 19 (Figure 26B) n'est pas confirmé par le taux de division (Figure 26A et C). De même, la mesure d'azote cellulaire vers le jour 19,3 est anormalement élevée (Figure 26E) et l'épaulement créé dans le signal du taux d'acquisition n'est pas reproduit dans l'autre méthode de calcul (Figure 26D et F), ce qui cause une anomalie dans le bilan d'azote (Figure 26F).

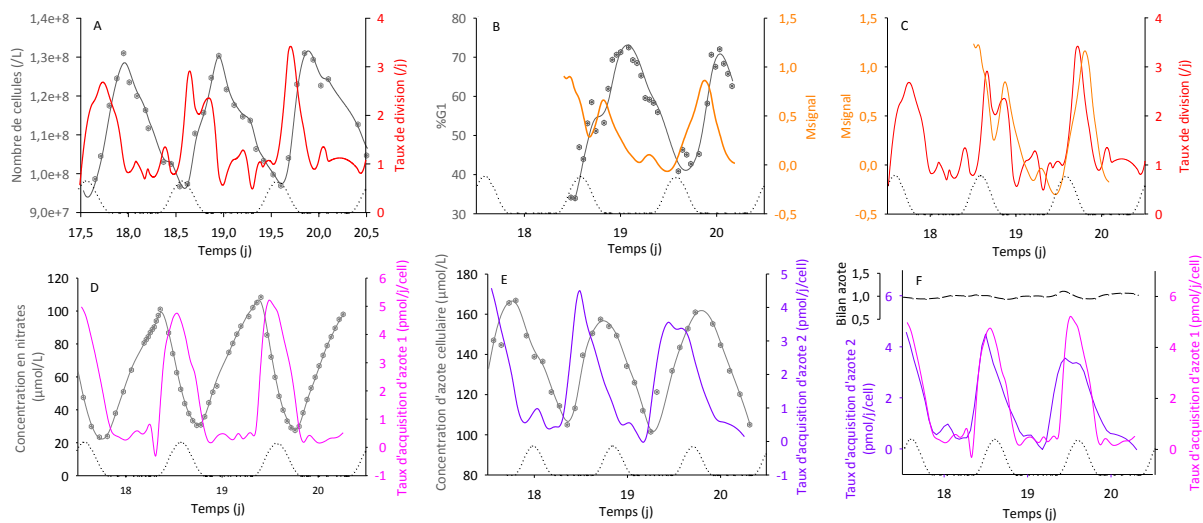


Figure 26. Résultats bruts, lissés et dérivés illustrant l'évaluation de la confiance à apporter à l'information.

5. Choisir les acteurs et les conditions expérimentales

5.1. Choisir le meilleur candidat

5.1.1. Etablissement du cahier des charges et choix du meilleur candidat

L'espèce choisie doit être compatible avec l'usage des cultures en continue, c'est à dire ne pas former de biofilm sur les parois ou les canules de prélèvement, ne pas former d'agrégats, et ne pas être sensible à l'agitation. Son taux de croissance maximum doit être suffisamment élevé pour autoriser le volume de prélèvement dédié aux mesures. Le candidat doit également résister à la pression exercée par la filtration. En outre, il doit être compatible avec les performances du compteur de particules, notamment en termes de taille. En effet, le HIAC ne mesure fidèlement que les cellules d'un diamètre supérieur à 5µm, alors que le cytomètre présente des risques d'obstruction pour des particules d'une taille supérieure à 30µm. Le candidat doit donc se situer dans une gamme de taille allant de 5 à 15µm de diamètre afin d'être correctement détectée par le HIAC, et de ne pas obstruer le cytomètre même s'il advenait que deux cellules se retrouve agrégées.

En considération du cahier des charges précédemment détaillé, nous avons choisi une diatomée, *Thalassiosira weissflogii*¹, dont la souche² est conservée stérilement au laboratoire sous cycle lumineux carré. Les diatomées possèdent un squelette externe siliceux, le frustule, qui leur confère une certaine résistance. La taille de cette espèce rentre dans la fourchette fixée par notre

¹ (Grunow in Van Heurck) G. Fryxell & Hasle, 1977, anciennement *Thalassiosira fluviatilis*

² souche CCMP 1050 provenant du Pravasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (Cf. Tableau 2 p69)

cahier des charges. De plus, cette espèce a déjà été cultivée en continu au sein du laboratoire, ce qui garantit sa viabilité pour les cultures à réaliser, notamment elle ne forme ni colonies ni biofilm.

5.1.2. *Thalassiosira weissflogii*

Le genre des bacillariophyceae est dominant dans les eaux riches en nutriments, et donc largement responsable de la production primaire aquatique et des flux de matières dans l'océan (Sarhoux *et al.* 2005). Leur frustule est composé de deux thèques (s'emboitant comme les couvercles d'une boîte à camembert), elles mêmes constituées d'une valve (dans notre analogie : le fond ou le couvercle de la boîte) et du cingulum (le bord). Les échanges avec le milieu extérieur, tel que la prise de nitrate, sont assurés par des perforations micrométriques formant des motifs caractéristiques de l'espèce.

La principale méthode de reproduction est végétative, une cellule mère se divise en deux cellules filles. Chaque cellule fille hérite d'une des deux thèques de la cellule mère, et celle que la cellule fille synthétise est plus petite que celle qu'elle a hérité. Théoriquement, la taille moyenne de la population doit donc diminuer au fil des générations. Lorsque la population atteint une taille critique, une reproduction sexuée conduit à la formation d'une cellule de plus grosse taille, l'auxospore (Von Dassow *et al.* 2006). Ecologiquement, la diminution de la taille est supposée servir d'horloge dans la planification de la reproduction sexuée (Lewis 84, Armbrust & Chisholm 1992). Cependant, comme dans d'autres études longues conduites avec *Thalassiosira weissflogii* (Von Dassow *et al.* 2006), nous n'avons pas observé ce genre de phénomène au cours de nos 4 mois d'expériences. Pour comprendre pourquoi, il faut savoir que la reproduction sexuée provoque un manque à gagner pour la cellule. En effet, la méiose occasionne une discontinuité dans la croissance somatique. Elle provoque également une perte de matière car une partie des gamètes ne sont pas fécondés. Lorsque la population est maintenue en phase de croissance exponentielle (c'est le cas en turbidostat), les cellules n'ont donc pas intérêt à effectuer de méiose, sans quoi leur taux de croissance ne leur permettrait plus de se maintenir. Les cellules capables d'ajuster la taille de leur frustule à chaque génération (Von Stosch 1965) sont donc sélectionnées car cette caractéristique conduit à la perte du processus de réduction de taille, qui est à l'origine de la reproduction sexuée (Von Dassow *et al.* 2006).

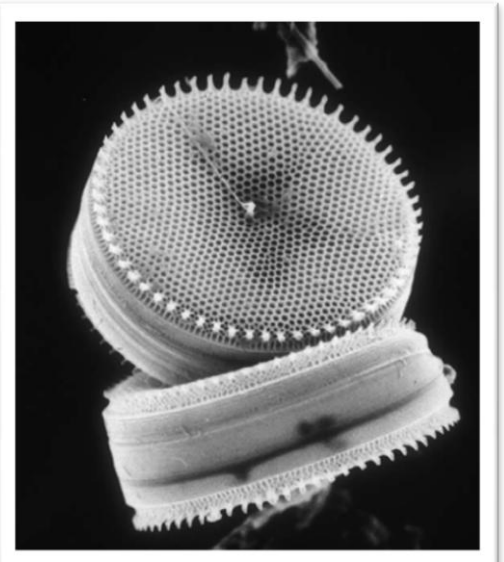


Image 1. Cellules du genre *Thalassiosira*
photographiées au microscope électronique à balayage. (document Alfred Wegener Institute)

Une étude biogéographique rapide de l'espèce montre une répartition assez globale. En se basant sur les sites d'échantillonnage des différentes souches enregistrées par le CCMP¹ et le CCAP² (Tableau ci-dessous), la présence marine de *T. weissflogii* est reportée dans des bassins (Atlantique, Pacifique) et milieux (tempéré, tropical, froid) très différents. De plus, cette souche est euryhaline (Radchenko & Il'yash 2006), si bien que sa présence est également reportée en milieu saumâtre (Caraus 2002, Hällfors 2004).

Tableau 2. Caractéristiques des différentes souches de *Thalassiosira weissflogii* cultivées au CCMP (Etats-Unis) et au CCAP (Ecosse).

souche	site d'échantillonnage	zone	type de milieu	date d'isolement
CCMP 1010	entre les Bermudes et New York, Etats-Unis	Atlantique Nord	Tropical / Tempéré	1969 (Hargraves)
CCMP 1047	Long Island, Etats-Unis	Atlantique Nord	Tempéré	1974 (Hargraves)
CCMP 1048	Massachusetts, Etats-Unis	Atlantique Nord	Tempéré	1976 (Guillard)
CCMP 1049	Long Island, Etats-Unis	Atlantique Nord	Tempéré	1968 (Hargraves)
CCMP 1050	Californie, Etats-Unis	Pacifique Nord	Tempéré	1959 (Dodson)
CCMP 1051	Kahalulu, Hawaï	Pacifique Nord	Tropical	1985 (York)
CCAP 1085/18				
CCMP 1052	Fjord d'Olso, Norvège	Atlantique Nord	Froid	1978 (Syverstsen)
CCMP 1053	Portugal	Atlantique Nord	Tempéré	1973 (Sampyo)
CCMP 1587	Mer de Java, Indonésie	Pacifique Sud	Tropical	1992 (Hargraves)
CCAP 1085/1	Mer du Nord, Angleterre	Atlantique Nord	Tempéré	1975 (Belcher)

5.2. Choisir les conditions de culture

Pour éviter toute limitation due à d'autres éléments que l'azote, le milieu utilisé pour la culture est une préparation de type f/2 (Guillard & Ryther 1962) apportant tous les éléments en excès, dont la silice qui est nécessaire à la formation du frustule. L'azote est ajouté au milieu de culture sous forme de nitrate avec une concentration qui est fonction des expériences à conduire: chémostat ou turbidostat.

L'eau de mer utilisée pour la préparation du milieu est prélevée à l'entrée de la rade de Villefranche-sur-Mer ('point B', site pérenne du suivi SOMLIT, Image 2) à 2m de profondeur sur un fond de 80m, puis filtrée sur 1µm avant d'être stockée plusieurs semaines. Lors de la préparation des milieux, l'eau est filtrée sur 0,22µm puis autoclavée (20 min à 110°) dans des bidons de 20L en polycarbonate (Nalgene Nunc International). Les éléments nutritifs (nitrate, silicate, métaux traces et vitamines) sont ajoutés à l'aide d'une seringue stérile munie d'un filtre de maille 0,25µm (Corning SFCA).

¹ CCMP : Pravasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, Etats-Unis. ccmp.biogel.org

² CCAP : Culture Collection of Algae and Protozoa, Ecosse. ccap.ac.uk

Image 2. Image satellite de localisation du site de prélèvement d'eau dit "point B" au large de Villefranche-sur-Mer (Alpes-Maritimes, France). Document GoogleEarth.



5.3. Choisir les expériences à réaliser

L'approche choisie pour étudier l'impact du statut physiologique des cellules sur la prise d'azote est de mesurer un certain nombre de caractéristiques chez des populations soumises à différentes combinaisons de signaux lumineux et de régimes azotés (Tableau 3, p72). Les cultures en mode « **turbidostat** » commencent sans renouvellement mais avec un milieu riche en azote. La croissance est donc exponentielle. Une fois que la densité cellulaire atteint $10^8.L^{-1}$, l'équilibre est maintenu en ajustant le taux de dilution au taux de croissance calculé pendant la phase exponentielle. Ensuite, il est si nécessaire ajusté au taux de croissance moyen de la population calculé sur 24h. A une concentration de 10^8 cellules. L^{-1} , le niveau de nitrate résiduel dans la culture n'est pas limitant pour la croissance. En mode **chemostat**, le taux de dilution est fixé à une valeur inférieure au taux de croissance maximum, ce qui conduit à un état de limitation. Le taux de croissance s'ajuste au taux de dilution et la concentration d'azote particulière égale la concentration de nitrate dans le milieu de renouvellement (Cf. 1.2 page 52). Chaque expérience est conduite dans deux bioréacteurs répliqués.

L'expérience référence « **témoin** » est conduite en l'absence de limitation nutritionnelle sous un cycle lumineux diurne (12:12). Ces conditions conduisent à un taux de croissance moyen journalier de $1,4j^{-1}$, valeur sur laquelle nous ajustons le taux de dilution (mode turbidostat). Au cours des autres expériences, seules les variables forçantes expressément citées diffèrent de ces conditions de référence. Les cultures sont préacclimatées sur les conditions *témoin* (sauf exception mentionnée) avant l'application des conditions propres aux différentes expériences.

Le rôle du statut azoté est testé dans trois expériences où l'apport d'azote est diminué. Dans *Nlim1* et *Nlim2*, les taux de dilution sont fixés par l'utilisateur en dessous du taux de croissance maximum (mode chemostat). Dans *Nstarv*, la culture est renouvelée par un milieu dépourvu d'azote.

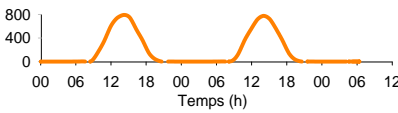
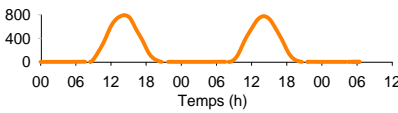
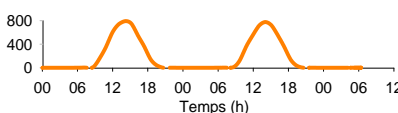
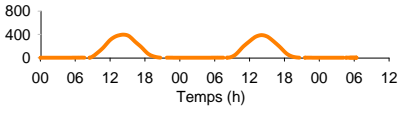
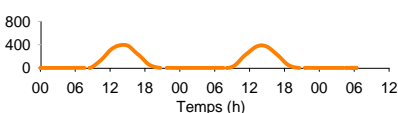
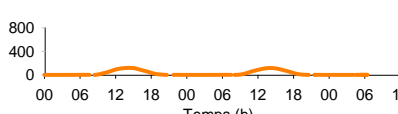
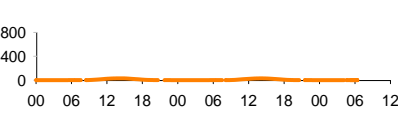
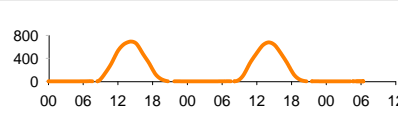

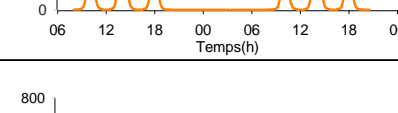
Trois expériences portent sur l'effet d'une diminution de la dose de lumière. Dans *Llim0*, *Llim1* et *Llim2*, les doses de lumière sont divisées respectivement par 2, 6 et 30. Les taux de dilution sont ajustés afin d'éviter à la fois un lessivage des cultures et une limitation de la croissance par l'azote. Il en est de même dans *pré-ML* où la dose de lumière est diminuée d' $1/8$ par rapport au témoin.

Enfin, l'effet du signal variable sur la synchronisation est étudié en modifiant le signal lumineux dans deux expériences. Des cultures synchronisées sur un cycle lumineux diurnes sont exposées pendant 60h sous éclairage constant dans *CL* (constant light). Dans *ML*, le nouveau signal lumineux est une simulation des conditions ressenties dans une couche de mélange (*Mixed Layer*) en idéalisant la trajectoire lagrangienne des cellules. Dans cette dernière condition, les cultures sont préacclimatées dans les conditions de l'expérience *pré-ML*.

6. Imaginer un descripteur original : le signal de Mitose

Nous souhaitons étudier l'effet de la mitose sur la prise de nitrate et, pour ce faire, nous devons la localiser à l'échelle diurne. Or, les phases G2 et M ne sont pas discernables à partir du contenu cellulaire en ADN. Cependant, comme la seconde intervient à la fin de l'intervalle G2/M, et sur l'hypothèse d'un phénomène bref à l'échelle du cycle cellulaire, nous supposons qu'une grande partie de la population est en mitose au moment où le pourcentage de cellules en G1 (pG1) commence à réaugmenter. Cette idée nous a conduits à utiliser la dérivée du pG1 pour localiser temporellement les passages massifs en mitose au sein de la population. Nous discuterons de la représentativité et de la légitimité de ce signal à la fin du manuscrit (p189).

Tableau 3. Conditions lumineuses et nutritionnelles des différentes expériences discutées dans ce manuscrit.

	Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
	<i>Témoin</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
Limitation par l'azote	<i>Nlim1</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 0,69/j μ s'ajuste sur D (chemostat) Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
	<i>Nlim2</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 0,5/j μ s'ajuste sur D (chemostat) Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
	<i>Nstarv</i>	Max = 400 Dose = 8,5 	D = 0,9/j Sin = 0 $\mu\text{mol}/\text{L}$
Limitation par la lumière	<i>Llim0</i>	Max = 400 Dose = 8,5 	D = 0,9/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
	<i>Llim1</i>	Max = 120 Dose = 4,2 	D = 0,5/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
	<i>Llim2</i>	Max = 20 Dose = 0,6 	D = 0,03-0,5/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
	<i>Pré-ML</i>	Max = 700 Dose = 15 	D = 1,4/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
Modification du signal de lumière	<i>ML</i>	Max = 2200 Dose = 15 	D = 0,9/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
	<i>CL</i>	Max = 400 Dose = 35 	D = 2,0/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

Chapitre III

Le cycle cellulaire conditionne t'il l'acquisition d'azote ?



Pause, by rithwick

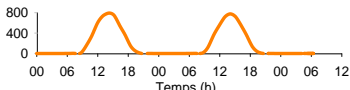
III. Conditionnement de l'acquisition d'azote par le cycle cellulaire.

La prise d'azote des organismes photosynthétiques planctoniques est depuis longtemps reliée à sa disponibilité dans le milieu, notamment par la loi de Michaelis-Menten qui fut établie en conditions stables de nutriments. Depuis, il est reconnu qu'en dehors des conditions d'équilibre (lors de variations d'intensité lumineuse ou de disponibilité en substrat), le statut physiologique de la cellule conditionne également la prise d'azote. Au-delà, l'implication du cycle cellulaire sur les processus d'acquisition d'azote a été très peu étudiée. Toutefois, quelques indices, comme la transcription variable du gène codant pour les transporteurs de nitrates au cours du cycle cellulaire, suggèrent un effet du cycle cellulaire sur la nutrition azotée (Hildebrand & Dahlin 2000). Par ailleurs, la diminution de l'absorption de nitrates en fin de journée précédant sa réaugmentation quelques heures plus tard en l'absence de lumière (Pawlowski 2004) peut résulter de l'interférence de la mitose sur la prise d'azote. Dans ce chapitre, nous porterons donc un regard attentif sur ce phénomène chez *Thalassiosira weissflogii*.

1. Suivi du métabolisme en conditions non limitantes

Commençons par étudier une population synchronisée sur un cycle lumineux diurne en turbidostat, c'est à dire en conditions nutritionnelles non limitantes, nous parlerons de conditions « *témoin* » (Tableau 4). Les données discutées ci-après ont été récoltées à l'équilibre (18 jours après inoculation), comme en atteste l'égalité entre les moyennes journalières du taux de division et des taux spécifiques d'acquisition d'azote et de fixation de carbone ($1,4 \cdot j^{-1}$).

Tableau 4. Rappel des conditions de l'expérience "témoin"

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
Témoin	Max = 800 Dose = 17 	D = $1,4/\text{j}$ D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = $200 \mu\text{mol}/\text{L}$

1.1. Localisation des événements de mitose quotidien

1.1.1. Utilisation du dénombrement cellulaire

Dans cette expérience, la population est stable sur plusieurs jours, mais présente des variations diurnes importantes (Figure 27). Son taux de division moyen de 1.4 j^{-1} correspond à 2 divisions quotidiennes ($1,4/\ln(2)$). Il est cohérent avec les valeurs reportées dans la littérature (Nelson & Brand 1979, Chisholm & Costello 1980, Clark *et al.* 2002a). Au cours d'un jour, le nombre de cellules dans le bioréacteur augmente globalement entre 15h et minuit et diminue le reste du temps. Au cours de cette diminution, un épaulement est généralement observable en fin de nuit.

Le calcul du taux de division (Figure 27) montre qu'une forte proportion de la population se divise entre 15h et minuit. Un ou deux événements de division de moindre importance sont également visibles au cours de la deuxième partie de la nuit. Le fait que le taux de division instantané de la population ne soit jamais nul est le signe d'une synchronisation partielle. Malgré cela, la majeure partie de la population se divise au cours d'une période particulière, que nous qualifierons d'événement principal de division.

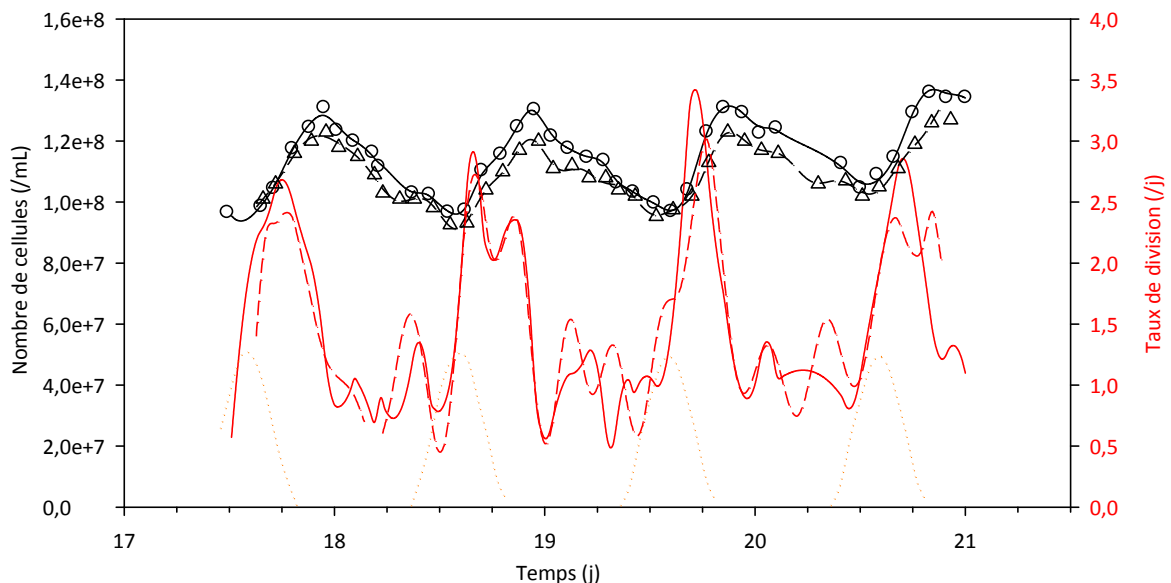


Figure 27. Dénombrement cellulaire (points = mesures, courbe = lissage) **et taux de division (j^{-1})** calculé au cours de l'expérience *témoin* dans les deux réplicats de culture. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne. Nous noterons que les deux cultures, réplicats l'une de l'autre, présentent le même comportement en termes de taux de division.

1.1.2. Utilisation du suivi du cycle cellulaire

Le pourcentage de cellules en phase G1 est maximum à minuit (autour de 75 %), diminue jusqu'au milieu de la phase de jour, avant de réaugmenter dès la fin de la journée (Figure 28). Le pourcentage de cellules en S n'est jamais supérieur à 5 %, si bien que les variations du pourcentage de cellules en G2 sont globalement inverses de celles en G1. Les moyennes journalières du pourcentage de cellules dans les différentes phases sont de 56 % en G1, 40 % en G2/M et 4% en S. Tout comme le taux de division instantané de la population n'est jamais nul, le pourcentage de cellules en phases G1 et G2/M n'égale jamais zéro ou 100%, rappelant que la population n'est que partiellement synchronisée.

Le signal de mitose montre un pic majeur en fin de journée (Figure 28). Ce pic est dédoublé au cours du jour 18, la première partie est centrée en début de journée et la seconde autour de 20 heures. Ainsi, le suivi du cycle cellulaire met en évidence un événement de mitose principale de quelques heures centré autour de 18-20h, ce qui n'écarte pas l'occurrence asynchrone d'autres événements mitotiques en dehors de cet intervalle.

→ **La superposition du taux de division et du signal de mitose permet de confirmer que l'événement de mitose principal se situe entre la fin de la journée et le début de la nuit.** Notons que ces deux signaux sont proches, notamment le double pic au cours du jour 18 est observé conjointement (Figure 29).

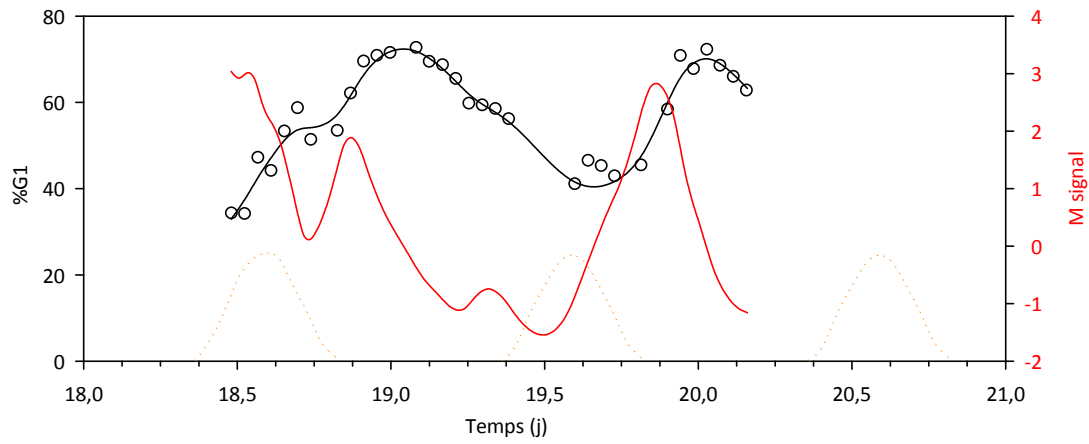


Figure 28. Pourcentage de cellules en phase G1 et **signal de mitose** calculé au cours de l'expérience *témoin* (temps en jour). La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne.

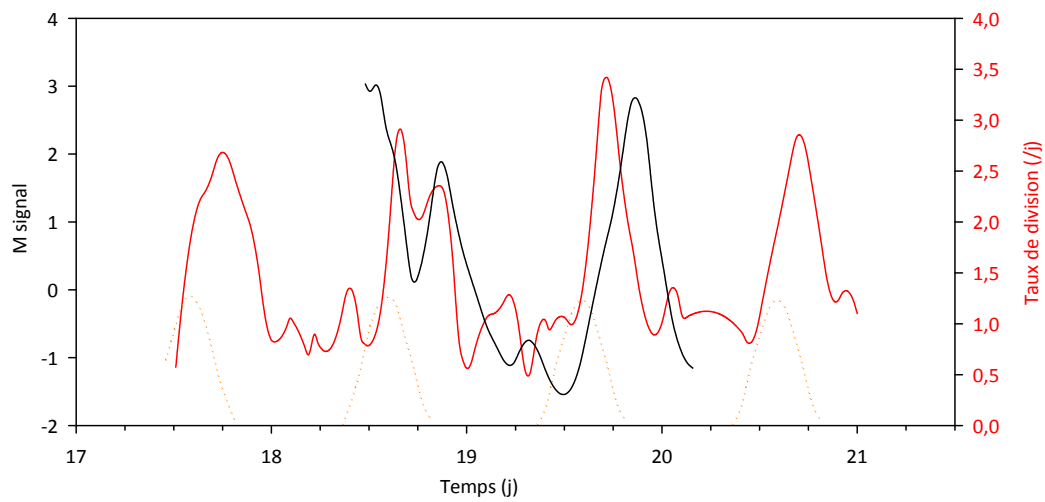


Figure 29. Superposition du **taux de division** ($.j^{-1}$) et du **signal de mitose** calculés au cours de l'expérience *témoin* (temps en jour).

1.2. Identification des phases d'acquisition de matière

1.2.1. Acquisition d'azote inorganique

La concentration en nitrates dans le bioréacteur n'est jamais limitante, elle varie de $20\text{-}30\mu\text{mol.L}^{-1}$ en fin de journée à $100\mu\text{mol.L}^{-1}$ au levé du jour (Figure 30). La concentration en azote cellulaire montre une évolution opposée. Elle augmente au cours de la journée et diminue de nuit autour d'une valeur moyenne de $130\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figure 31). Les deux bioréacteurs répliqués ont le même comportement.

La Figure 32 montre que l'acquisition d'azote a essentiellement lieu le jour. Elle débute dès le début de l'éclairement, atteint un maximum vers 12h puis commence à diminuer jusqu'à la fin de la phase claire. De nuit, l'acquisition d'azote se poursuit mais sa cinétique est réduite. La part nocturne de l'acquisition ne représente que 20% des $1,7\text{pmolN}$ prélevés quotidiennement par la cellule.

→ La disparition des nitrates dans les cultures et l'accumulation d'azote dans les cellules montrent que la prise d'azote a lieu essentiellement le jour.

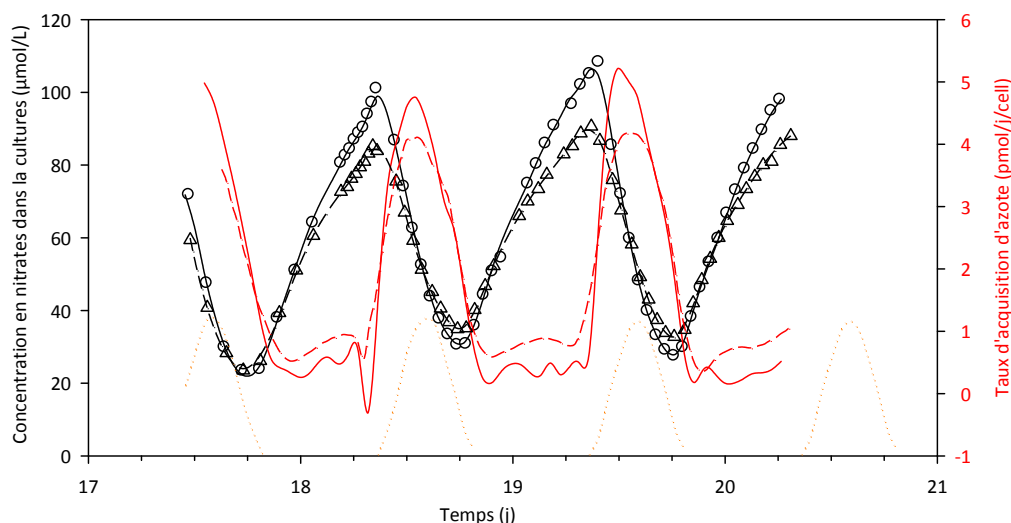


Figure 30. Concentration en nitrate dans le bioréacteur et **taux d'acquisition d'azote** associé au cours de l'expérience *témoin* dans les deux répliqués de culture. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne.

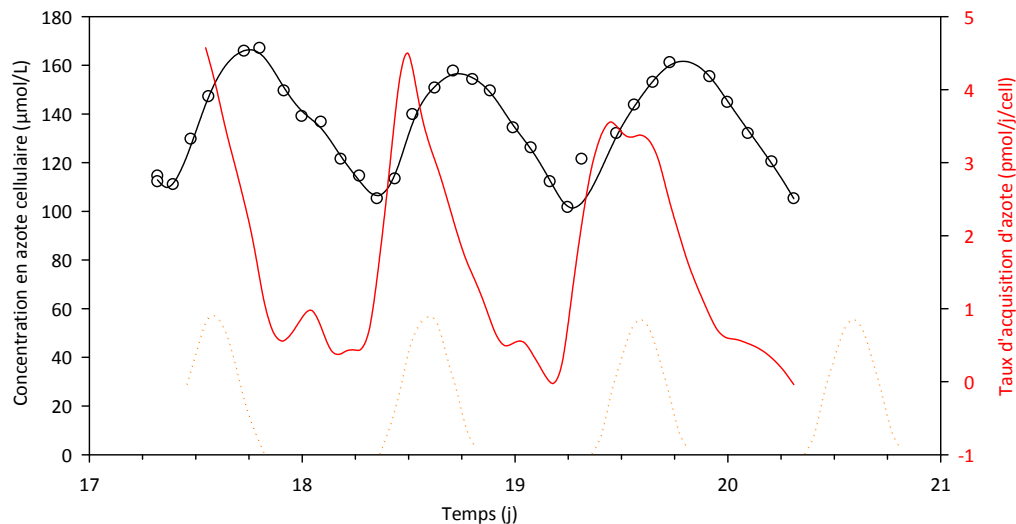


Figure 31. Concentration en azote cellulaire et **taux d'acquisition d'azote** associé au cours de l'expérience *témoin*. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne.

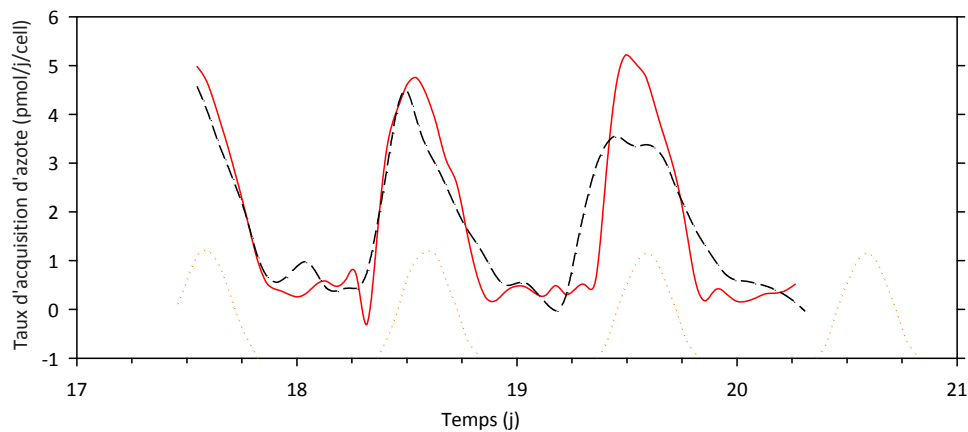


Figure 32. Taux d'acquisition d'azote calculé au cours de l'expérience *témoin* à partir de la **concentration nitrate dans les cultures** (continue rouge) et de l'**azote cellulaire** (tiretée noire). Ces deux mesures indépendantes de la prise d'azote donnent des résultats très similaires. L'anomalie observée au cours du jour 19 n'est du qu'à un point de mesure d'azote cellulaire. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne.

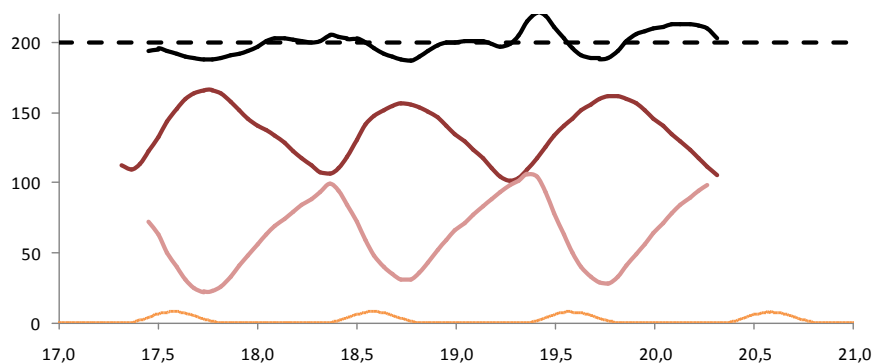


Figure 33. Somme des différentes formes d'azote dans le bioréacteur (courbe noire pleine), **concentrations en nitrate dans la culture** et **azote cellulaire** (µmol/L) au cours de l'expérience *témoin* (temps en jour). La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne et la courbe noire tiretée symbolise la concentration en azote dans le milieu de renouvellement.

Afin de s'assurer que tout l'azote introduit dans le bioréacteur sous forme de nitrate a bien été utilisé par les microalgues, le bilan d'azote est calculé. Il est compris entre 0,95 et 1,05 sauf point particulier. La conservation de la matière azotée est illustrée dans la Figure 33 : la somme de l'azote cellulaire et inorganique égale la concentration en azote du milieu de renouvellement. La quasi-totalité de l'azote absorbé se retrouve dans le matériel particulaire, ce qui réfute 1/ une possible excrétion d'azote sous une forme non mesurable et 2/ une possible compétition avec d'autres micro-organismes (bactéries ou autres microalgues).

1.2.2. Fixation de carbone

La quantité de carbone par cellule augmente la journée et diminue de nuit avec un maximum au midi solaire (14h). En conséquence, le taux de fixation de carbone est positif le jour et légèrement négatif de nuit (Figure 34). Nous supposons que la respiration nocturne nécessaire au maintien des fonctions vitales est responsable de la perte de 5-7% des 13pmolC fixés par jour.

→ La fixation de carbone est strictement restreinte à la période d'éclairement.

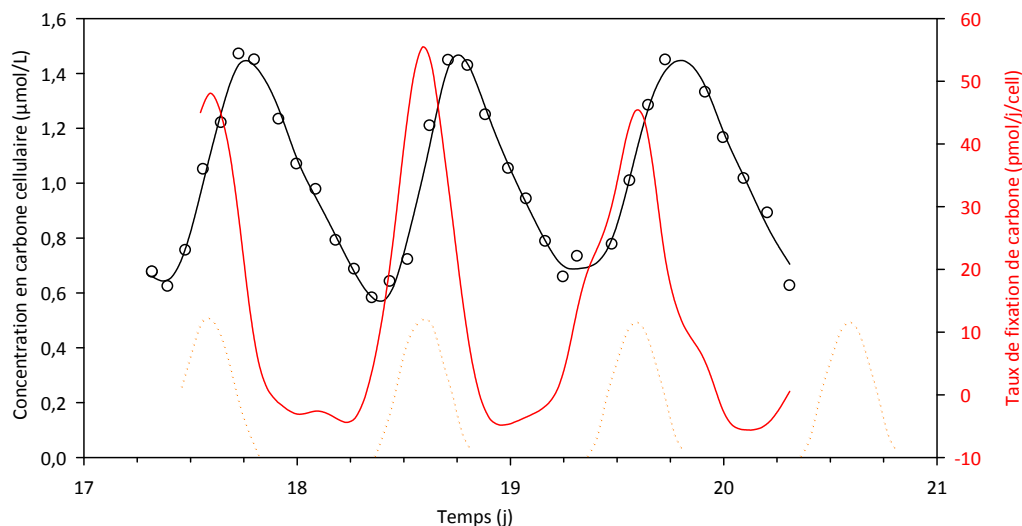


Figure 34. Concentration en carbone cellulaire et **taux de fixation de carbone** au cours de l'expérience témoin. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne.

1.3. Conclusions de ces premières observations

Les acquisitions de carbone et d'azote se déroulent conjointement de jour et les processus mitotiques surviennent, ensuite, en fin de journée ou de nuit (Figure ci-dessous).

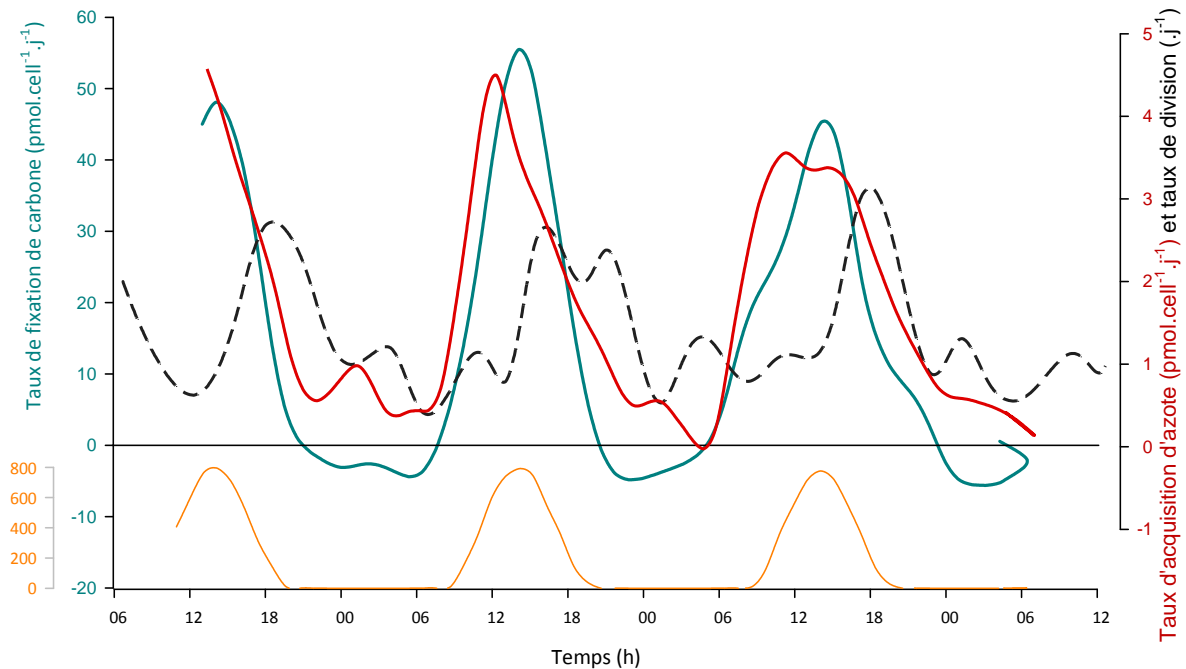


Figure 35. Taux d'acquisition d'azote calculé sur l'azote cellulaire (pmolN.j⁻¹.cell⁻¹), taux de fixation de carbone (pmolC.j⁻¹.cell⁻¹), taux de division (j⁻¹), et intensité lumineuse (μmolQuanta.m⁻².s⁻¹) au cours de l'expérience témoin.

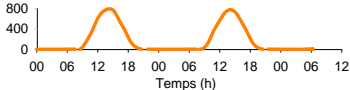
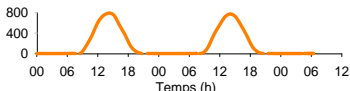
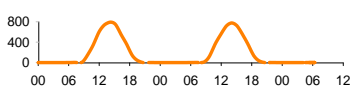
Ces premières observations séparent temporellement la mitose des processus de croissance somatique (acquisition d'azote et fixation de carbone). Plus particulièrement, les maxima du taux d'acquisition d'azote (en rouge) précèdent ceux du taux de fixation de carbone (en bleu) de quelques heures. Ce décalage laisse supposer un effet de la mitose sur l'acquisition d'azote mais il est hâtif, à ce stade, d'émettre quelque hypothèse. Dans la suite du chapitre, nous allons donc rechercher avec des conditions de croissance différentes des indices qui tendraient à affirmer ou infirmer cette première supposition.

2. Suivi du métabolisme en conditions nutritionnelles ou lumineuses limitantes

2.1. Limitation par l'azote

Après acclimatation dans les conditions de l'expérience précédente (*témoin*), les cultures sont placées en mode chemostat de façon à limiter les cellules en azote. En conservant la concentration en nitrate dans le milieu de renouvellement et la dose de lumière, le taux de dilution est réduit respectivement à 0,69 et 0,5 J⁻¹ dans les expériences *Nlim1* et *Nlim2* (détails ci-dessous).

Tableau 5. Rappel des conditions des expériences "*témoin*", "*Nlim1*" et "*Nlim2*".

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
<i>Témoin</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Nlim1</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 0,69/j μ s'ajuste sur D (chemostat) Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Nlim2</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 0,5/j μ s'ajuste sur D (chemostat) Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

2.1.1. Localisation de la phase de mitose

Dans un premier temps, la diminution du taux de dilution induit un accroissement de la population. Quand l'azote devient limitant, un nouvel équilibre s'établit autour de $2,5 \cdot 10^8 \text{cellules} \cdot \text{L}^{-1}$. (Figure 36). La limitation réduit le taux de division journalier qui se stabilise respectivement autour de 0,75 et 0,71 j⁻¹ dans les expériences *Nlim1* et *Nlim2*. Dans ces nouvelles conditions, la population ne présente plus d'oscillations diurnes aussi marquées que dans l'expérience *témoin*, la population est donc fortement désynchronisée. En *Nlim1*, une phase de division majeure est toujours observée en fin de journée, et une autre de même ampleur en fin de nuit ou à l'aube. En *Nlim2*, le taux de division devient apériodique (Figure 36).

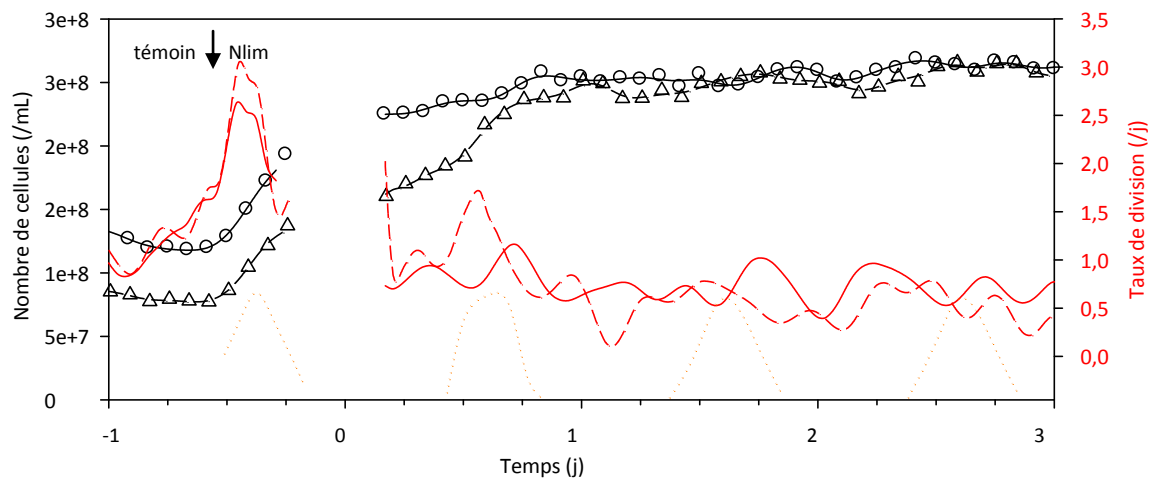


Figure 36. Nombre de cellules dans le bioréacteur et **taux de division cellulaire** au cours des expériences *Nlim1* (courbes continues) et *Nlim2* (courbes tiretées) dans les deux réplicats de culture. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne. La flèche localise le changement de conditions de croissance.

Le signal de mitose présente en *Nlim1* et *Nlim2* un double pic le jour où la limitation est instaurée (Figure 38). Le premier a lieu en fin de journée et le deuxième en fin de nuit. Ce comportement est globalement reproduit au cours des deux jours suivants, avec une intensité de plus en plus faible. L'affaiblissement du signal de mitose souligne lui-aussi l'effet désynchronisant de la limitation en azote.

2.1.2. Localisation des phases d'acquisition de matière

La présence de nitrate devient indétectable dans les cultures dès les premières heures de l'expérience et le reste jusqu'à la fin. La concentration en azote cellulaire décroît au lendemain de l'instauration de la limitation azotée pour tendre vers celle de l'azote inorganique du milieu de renouvellement, le bilan en azote est donc vérifié.

Les deux estimations de la prise d'azote s'accordent pour mettre en évidence une diminution du taux de 75 % en *Nlim1* et 85 % en *Nlim2* par rapport aux conditions non limitantes (Figure 37). Les variations du taux d'acquisition estimées d'après les mesures d'azote inorganique sont de plus faible amplitude que celles estimées d'après les mesures d'azote cellulaires. Nous expliquons cette différence par le fait que des variations de la concentration en substrat ont pu se produire en dessous du niveau de détection de nos instruments de mesure (Technicon Cf. p63). Quoi qu'il en soit, nous noterons que 1/ les variations observées ne sont plus en phase avec le cycle lumineux diurne et 2/ que les moyennes diurnes et nocturnes sont comparables (Figure 37).

Au contraire de l'azote, la concentration en carbone cellulaire présente des variations significatives en phase avec le cycle lumineux diurne. La fixation de carbone est toujours logiquement restreinte à la période d'éclairement (Figure 38).

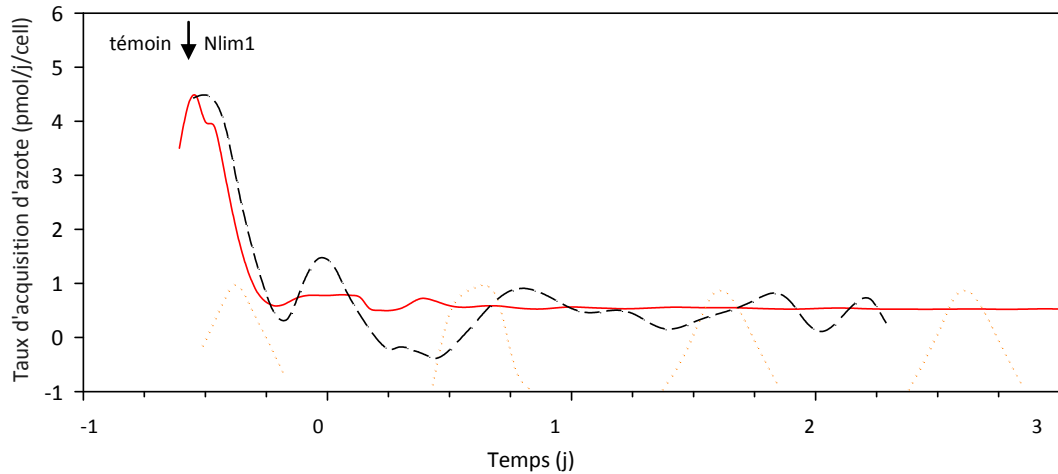


Figure 37. Taux d'acquisition d'azote calculé à partir de la concentration en nitrate dans la culture (rouge continue) et de l'azote cellulaire (noire tiretée) au cours de l'expérience *Nlim1*. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne

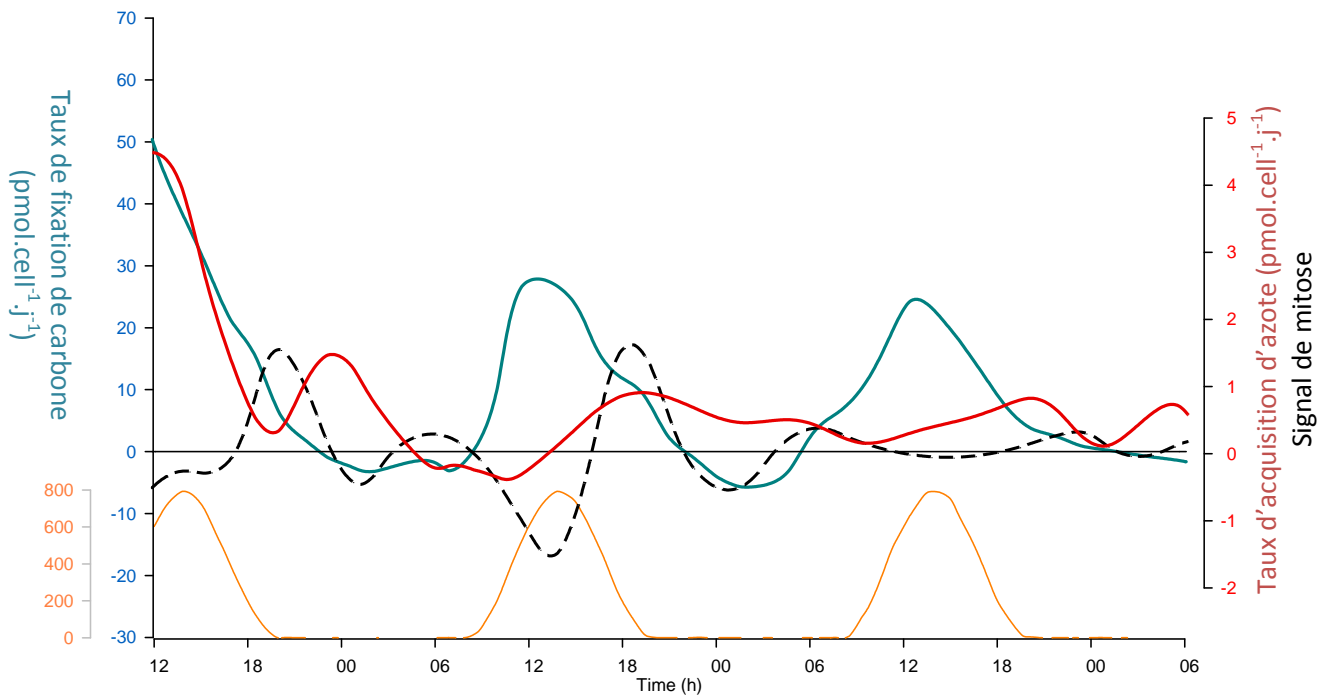


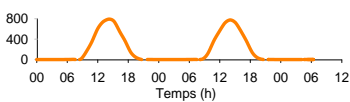
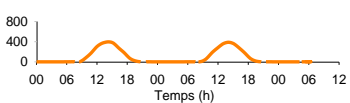
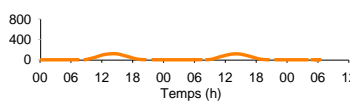
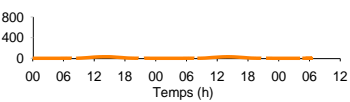
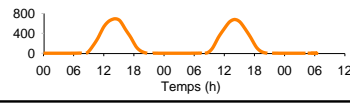
Figure 38. Taux d'acquisition d'azote calculé sur l'azote cellulaire ($\text{pmolN.j}^{-1}.\text{cell}^{-1}$), taux de fixation de carbone ($\text{pmolC.j}^{-1}.\text{cell}^{-1}$), signal de mitose, et intensité lumineuse ($\mu\text{molQuanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) au cours de l'expérience *Nlim1*.

→ Quand la croissance est limitée par l'azote, le signal de mitose n'est plus en phase avec le signal de lumière (Figure ci-dessus). L'acquisition de carbone a toujours lieu le jour, qu'il y ait ou non un événement principal de mitose au sein de la population. Les signaux de mitose et d'acquisition d'azote sont en opposition de phase au cours des premières 24 heures de l'expérience. Les variations relatives de ces signaux étant faibles par la suite, aucune opposition ne peut être mise en évidence.

2.2. Limitation par la lumière

Nous souhaitons maintenant tester l'hypothèse d'une opposition entre mitose et prise d'azote dans le cas d'une limitation de la croissance par la lumière. Après acclimatation des cultures dans les conditions de l'expérience *témoin*, quatre conditions lumineuses différentes sont testées. Les expériences *Llim0* et *pré-ML* sont conduites avec des conditions de lumière assez proche des conditions *témoin*. Nous souhaitons identifier comment une faible diminution de la dose de lumière modifie les observations faites en conditions *témoin*. Dans les expériences *Llim1* et *2*, nous suivons la réponse transitoire d'une population, acclimatée en conditions *témoin*, à une diminution plus sévère de la dose de lumière. Dans tous les cas, la croissance n'est pas limitée par l'azote.

Tableau 6. Rappel des conditions des expériences "*témoin*", "*Llim0*", "*Llim1*", "*Llim2*" et "*pré-ML*"

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
<i>Témoin</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Llim0</i>	Max = 400 Dose = 8,5 	D = 0,9/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Llim1</i>	Max = 120 Dose = 4,2 	D = 0,5/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Llim2</i>	Max = 20 Dose = 0,6 	D = 0,03-0,5/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Pré-ML</i>	Max = 700 Dose = 15 	D = 1,4/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

2.2.1. Expérience pré-ML (dose de lumière = 8/9^e témoin)

Sous un éclairage inférieur d'un neuvième à celui des conditions *témoin*, et toutes choses étant égales par ailleurs, le taux de division journalier est conservé à $1,4.j^{-1}$.

A l'échelle horaire, la période de jour est la phase principale d'acquisition d'azote et la phase exclusive de fixation de carbone (Figure 39). Les cinétiques d'acquisition de ces deux éléments ne montrent cependant pas le même comportement. Si les deux taux présentent une évolution parallèle au cours des premières heures d'éclairement, le maximum de la cinétique d'acquisition d'azote intervient vers 11h, trois heures avant celui de la fixation de carbone qui concorde avec le midi solaire.

Or, la Figure 39 montre que le signal de mitose est positif en seconde partie de journée, suggérant ainsi une interférence de la mitose dans les processus de d'acquisition d'azote.

2.2.2. Expérience Llim0 (dose de lumière = 1/2 témoin)

Avec une dose inférieure de moitié aux conditions *témoin*, le taux de division de la population est de $0,9.j^{-1}$. Notons que l'état de limitation par le carbone n'a pas été vérifié dans cette expérience (contrôle du pH non disponible).

Dans ces conditions, la succession des événements de prise de matière et de mitose sont conservés. Comme précédemment, la phase de fixation de carbone est limitée à la période d'éclairement et l'acquisition d'azote a principalement lieu de jour. Nous noterons que la vitesse d'acquisition d'azote est minimum lorsque le signal de mitose est maximum, puis réagmente en début de nuit (Figure 40).

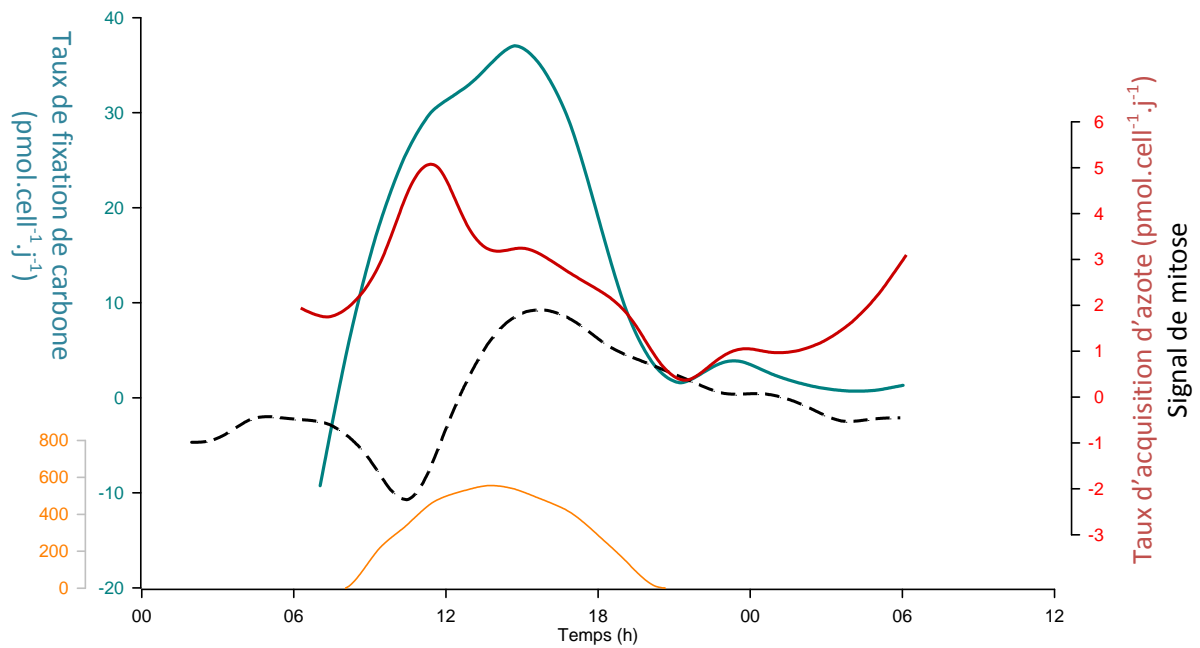


Figure 39. Taux d'acquisition d'azote calculé sur l'azote cellulaire ($\text{pmolN}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$), taux de fixation de carbone ($\text{pmolC}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$), signal de mitose, et intensité lumineuse ($\mu\text{molQuanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) au cours de l'expérience *pre-ML*.

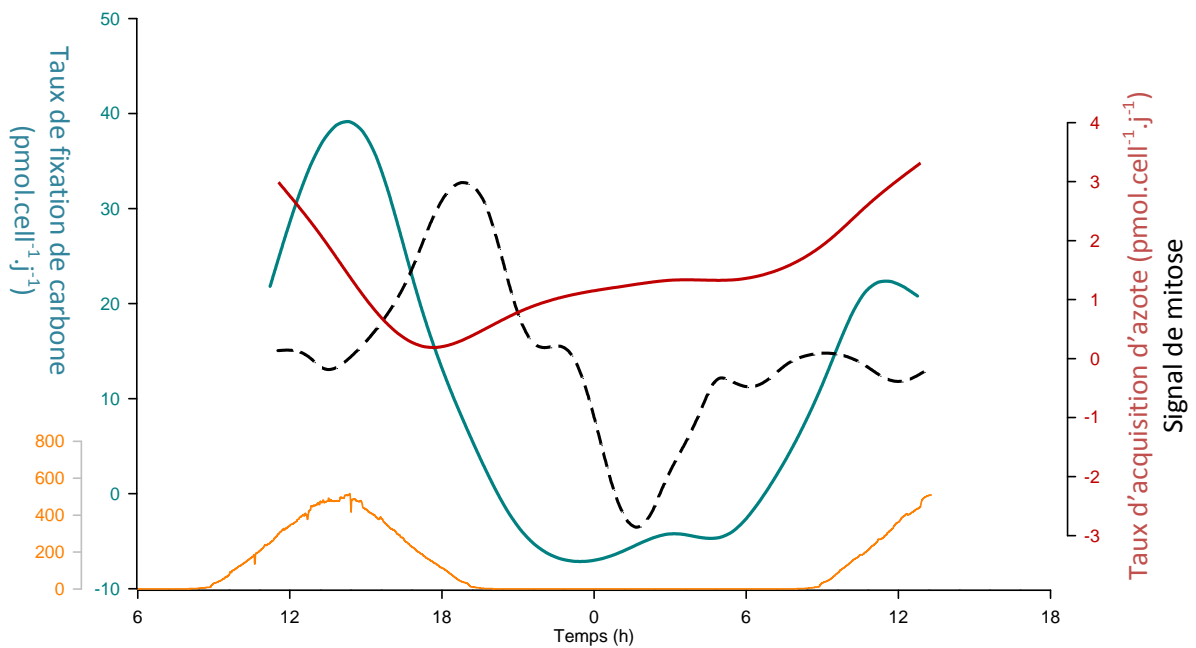


Figure 40. Taux d'acquisition d'azote calculé sur l'azote cellulaire ($\text{pmolN}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$), taux de fixation de carbone ($\text{pmolC}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$), signal de mitose, et intensité lumineuse ($\mu\text{molQuanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) au cours de l'expérience *Lim0*.

2.2.3. Expérience Llim1 (dose de lumière = $1/8^e$ de celle du témoin)

Le taux de division moyen de la population répond à la réduction du flux de photons par une diminution d'environ 55%, passant de $1,4$ à $0,64 \text{ j}^{-1}$ en deux jours. A l'échelle horaire, un évènement majeur de division est clairement visible entre la fin de la journée et le début de la nuit aux cours des jours suivant l'instauration des nouvelles conditions lumineuses (Figure 41). Au cours des trois jours de suivi, le signal de mitose montre des pics en phase avec ceux du taux de division (Figure 41).

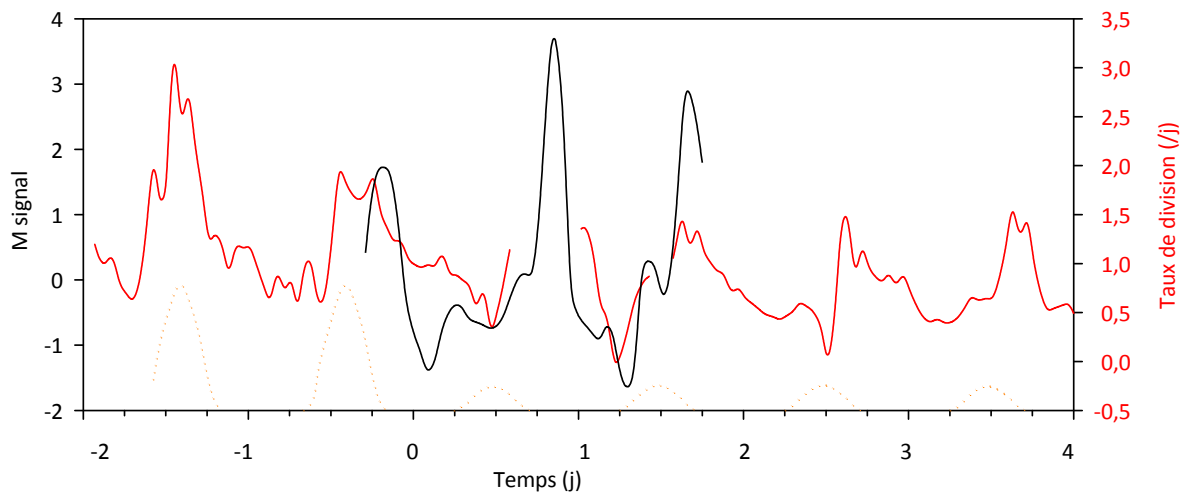


Figure 41. Superposition du **taux de division** et du **signal de mitose** calculés au cours de l'expérience Llim1. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne. Le manque de donnée à la fin du jour 2 est imputable au changement de taux de dilution.

Le taux d'acquisition d'azote moyen a chuté de 35% et celui de carbone de 55% au cours des deux premiers jours suivant l'instauration des nouvelles conditions lumineuse (Figure 42). Après 7 jours, ces taux ont chuté de 60% pour l'azote et 70% pour le carbone. Le bilan d'azote est conservé entre 0,95 et 1,05. Au sein d'un jour, les processus d'acquisition d'azote sont presque exclusivement restreints à la journée (Figure 42).

→ Une diminution de la dose de lumière telles qu'exercées précédemment ne provoque pas de changement qualitatif dans la succession des évènements (acquisition de matière et mitose) quotidiens (Figures 40, 41 et 43). Les processus d'acquisition de matière (N et C) se déroulent au cours de la journée et la mitose à lieu ensuite, en fin de journée ou de nuit. Cependant, le décalage des maxima d'acquisition d'azote (vers 11-12h) et de carbone (à 14h) suggère une interférence de l'évènement de mitose, qui a lieu dans la seconde partie de la journée.

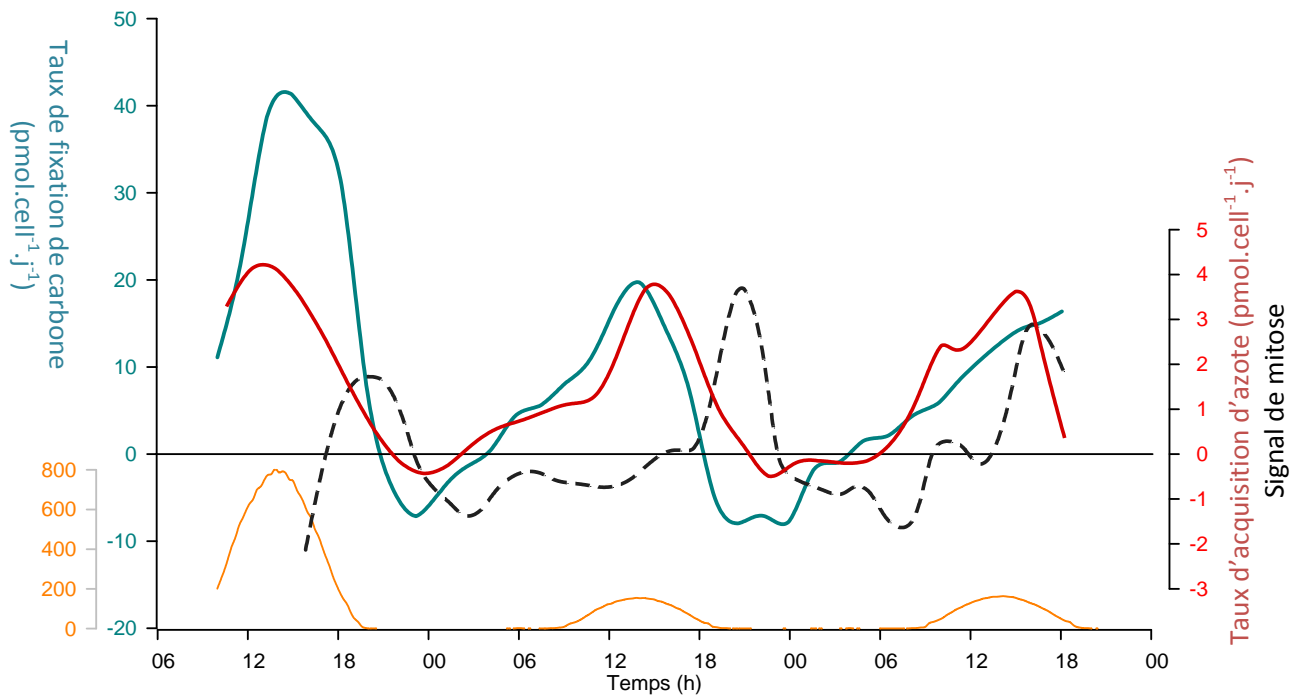


Figure 42. **Taux d'acquisition d'azote** calculé sur l'azote cellulaire (pmolN.j⁻¹.cell⁻¹), **taux de fixation de carbone** (pmolC.j⁻¹.cell⁻¹), **signal de mitose** et **intensité lumineuse** (μmolQuanta.m⁻².s⁻¹) au cours de l'expérience Llim1.

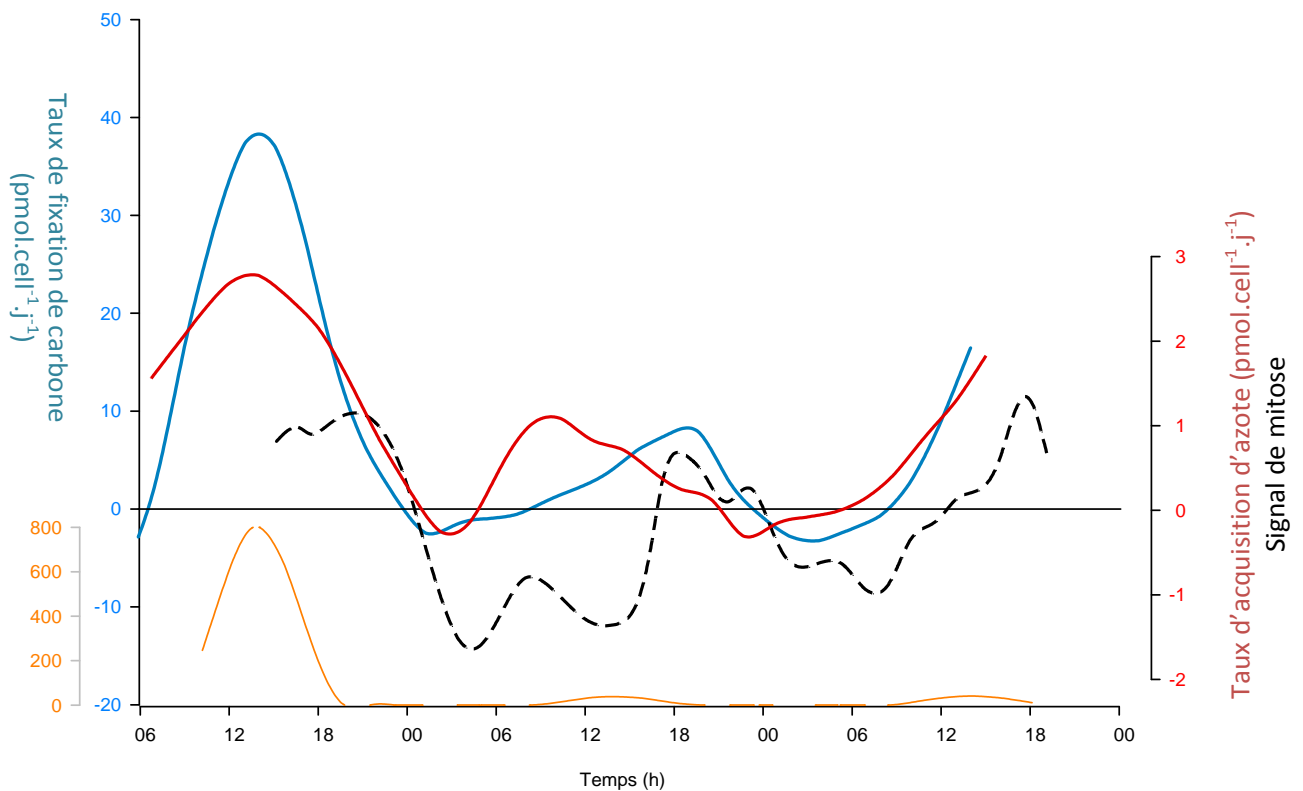


Figure 43. **Taux d'acquisition d'azote** calculé sur l'azote cellulaire (pmolN.j⁻¹.cell⁻¹), **taux de fixation de carbone** (pmolC.j⁻¹.cell⁻¹), **signal de mitose** et **intensité lumineuse** (μmolQuanta.m⁻².s⁻¹) au cours de l'expérience Llim2.

2.2.4. Expérience Llim2 (dose de lumière = 1/20e témoin)

La réduction du flux de photons est encore plus drastique en *Llim2* qu'en *Llim1* (Tableau 6). En conséquence, le taux de division moyen chute de $1,3$ à $0,6 \text{ j}^{-1}$ (-60%) au jour 0, à $0,1 \text{ j}^{-1}$ (-95%) au jour 1, et devient nul au jour 2 (Figure 44). Des variations sont toujours visibles au cours des premières 72h (Figure 44), elles localisent des phases principales de divisions à l'aube du premier jour, et au cours de la nuit suivante (flèches Figure 44). De faibles événements de mitose sont identifiés par le signal éponyme, à l'aube du premier jour, entre le crépuscule et le milieu de la nuit suivante et enfin en deuxième partie du jour suivant (flèches noires). Les oscillations du taux de division et du signal de mitose ne sont pas en phase au cours du premier jour en conditions de faible éclairage, sans doute à cause de la réponse du taux de division à l'instauration de la limitation.

Les taux d'acquisition d'azote et carbone décroissent de 80% au premier jour de limitation, de $1,6$ à $0,32 \text{ pmolN.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et de $11,3$ à $2,1 \text{ pmolC.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$. L'acquisition d'azote a lieu quasi exclusivement de jour, 9/10 de l'azote étant acquis durant cette phase (Figure 43).

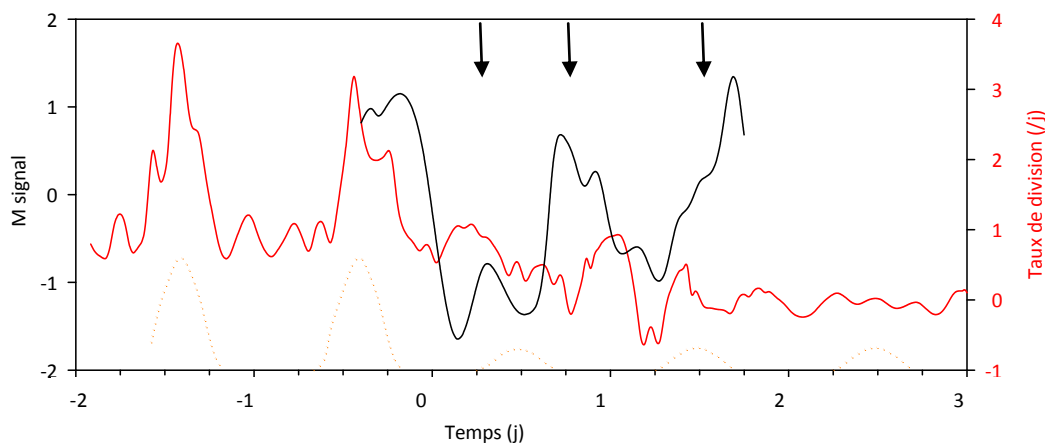


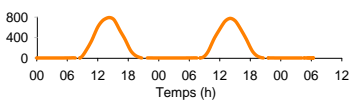
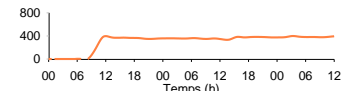
Figure 44. Superposition du **taux de division** et du **signal de mitose** calculés au cours de l'expérience *Llim2*. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne.

→ La dose de lumière à laquelle sont exposées les cultures ne leur permet pas de maintenir une croissance. Cependant, les observations faites au premier jour de l'expérience renforcent les suppositions induites par les expériences précédentes. En effet, une nette diminution de la cinétique d'acquisition d'azote est ressentie au moment de la division de la population alors que la fixation de carbone se poursuit pendant plusieurs heures (Figure 47).

3. Suivi du métabolisme lors d'un passage en lumière continu

Dans les expériences précédentes conduites sous cycles lumineux diurnes, nous expliquons une partie de la cinétique d'acquisition d'azote par la dynamique du cycle cellulaire. Cependant, nous ne pouvons pas écarter le fait que ces variations soient dues au signal lumineux sans s'en affranchir. C'est pourquoi nous exposons des cultures pré-acclimatées aux conditions de l'expérience *témoin* à une illumination continue pendant 52h (expérience *CL*, pour *constant light*). Le changement de régime de lumière s'accompagne d'un doublement de la dose journalière. Le taux de dilution est ajusté au taux de croissance moyen journalier (Cf. tableau ci-dessous).

Tableau 7. Rappel des conditions des expériences "Témoin" et "CL".

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
<i>Témoin</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>CL</i>	Max = 400 Dose = 35 	D = 2,0/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

3.1. Localisation des phases de mitose

En réponse aux nouvelles conditions lumineuses, le taux de division augmente à 2,3 j^{-1} au cours du premier jour et s'ajuste à 2,1 j^{-1} le jour suivant, cette légère diminution étant probablement due à l'auto-ombrage provoqué par le doublement de la biomasse algale dans le bioréacteur. A l'échelle horaire, le taux de division augmente fortement à la fin de la première phase de jour subjective¹. L'évènement principal de division dure plus longtemps qu'en conditions diurnes : il se poursuit jusqu'à la fin de la première nuit subjective (Figure 45). Deux autres périodes de divisions synchrones sont identifiables entre le crépuscule subjectif du deuxième jour et l'aube subjective du troisième jour. Enfin, un dernier pic de division précède la récupération du signal diurne. Un comportement identique à celui de l'expérience *témoin* est à nouveau observé dès le retour aux conditions diurnes (Figure 45).

¹ « Subjectif » fait référence au déroulement d'un cycle diurne normal (LD). En CL, la nuit subjective correspond par exemple à la période entre 20h et 8h pendant laquelle l'éclairement est nul en conditions LD.

Le comportement du signal de mitose s'apparente globalement à celui du taux de division. Les différences résident en un premier pic plus fin que celui du taux de division, et dans un décalage de 2h entre avec les pics observés au cours des secondes 24h (Figure 45).

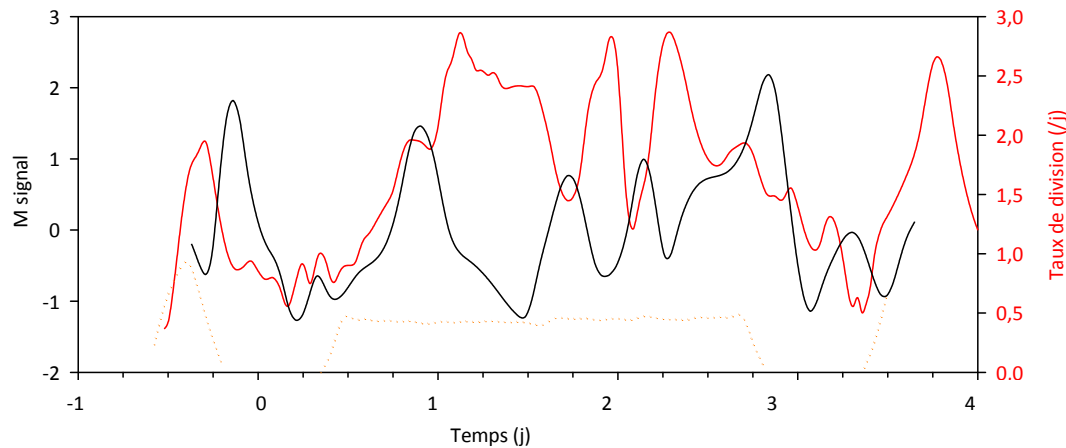


Figure 45. Superposition du **taux de division** et du **signal de mitose** calculés au cours de l'expérience CL. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne.

3.2. Localisation des phases d'acquisition de matière

Note : Dans cette expérience, l'ajustement du taux de dilution au taux de division n'aurait pas suffi à maintenir une concentration non limitante en nitrates. Des apports manuels ont été réalisés directement dans les bioréacteurs afin de maintenir une concentration en substrat supérieure à $20\mu\text{mol.L}^{-1}$. Chaque ajout engendre un artefact dans la mesure du taux d'acquisition d'azote correspondante.

Le taux d'acquisition d'azote journalier, estimé d'après les variations de nitrate et d'azote particulaire, augmente de 1,7 à $2,5\text{pmolN.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$ après l'instauration des conditions CL (Figure 46).

A l'échelle horaire, les oscillations de l'acquisition d'azote issue de la mesure de la concentration en nitrates sont trop bruitées pour que l'on puisse en dégager un signal clair (Figure 46). Nous noterons tout de même qu'elles enveloppent le signal calculé à partir des mesures de l'azote cellulaire. La cinétique d'acquisition d'azote de la première journée subjective (jour 0) ne diffère pas de celle des conditions *témoin* (Figure 46). Elle chute ensuite lors du crépuscule subjectif, alors que l'intensité lumineuse reste constante, puis reprend au cours de la deuxième partie de la nuit subjective. Elle traverse d'autres périodes faibles entre les crépuscule et début de nuit subjectifs suivants (entre les jours 1 et 2) et à la fin de la dernière journée (jour 2), juste avant la récupération du signal lumineux diurne.

Les variations du taux de fixation de carbone sont similaires à celles obtenues en conditions *témoin* au cours des 12h premières d'illumination continue (jour 0). Ensuite, l'amplitude des oscillations s'affaiblit et la cinétique devient apériodiques (Figure 51).

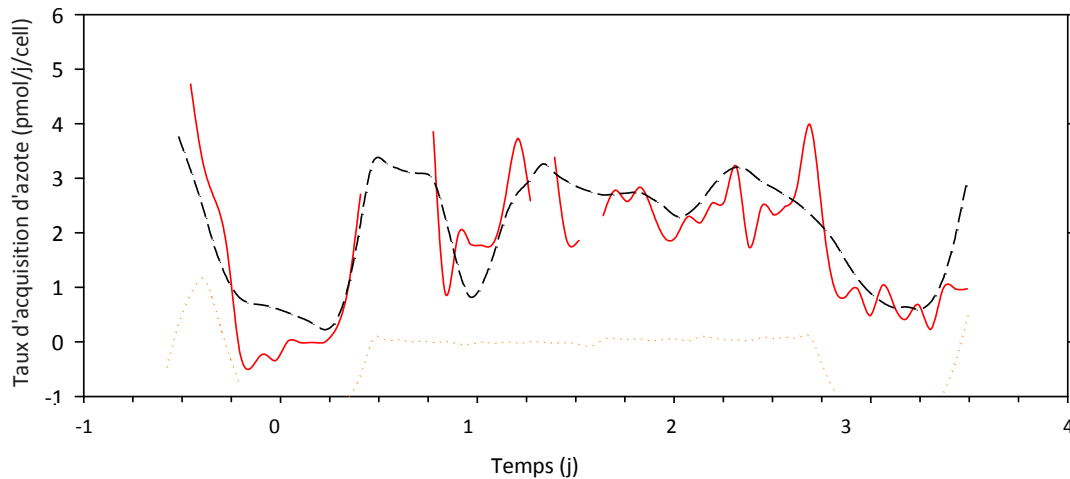


Figure 46. Taux d'acquisition d'azote calculé à partir de la concentration en nitrate dans la culture (rouge continue) et de l'azote cellulaire (noire tiretée) au cours de l'expérience CL. La courbe orange rappelle le cycle lumineux diurne. Les absences de données sur la courbe rouge sont dues aux ajouts de nitrates dans la culture.

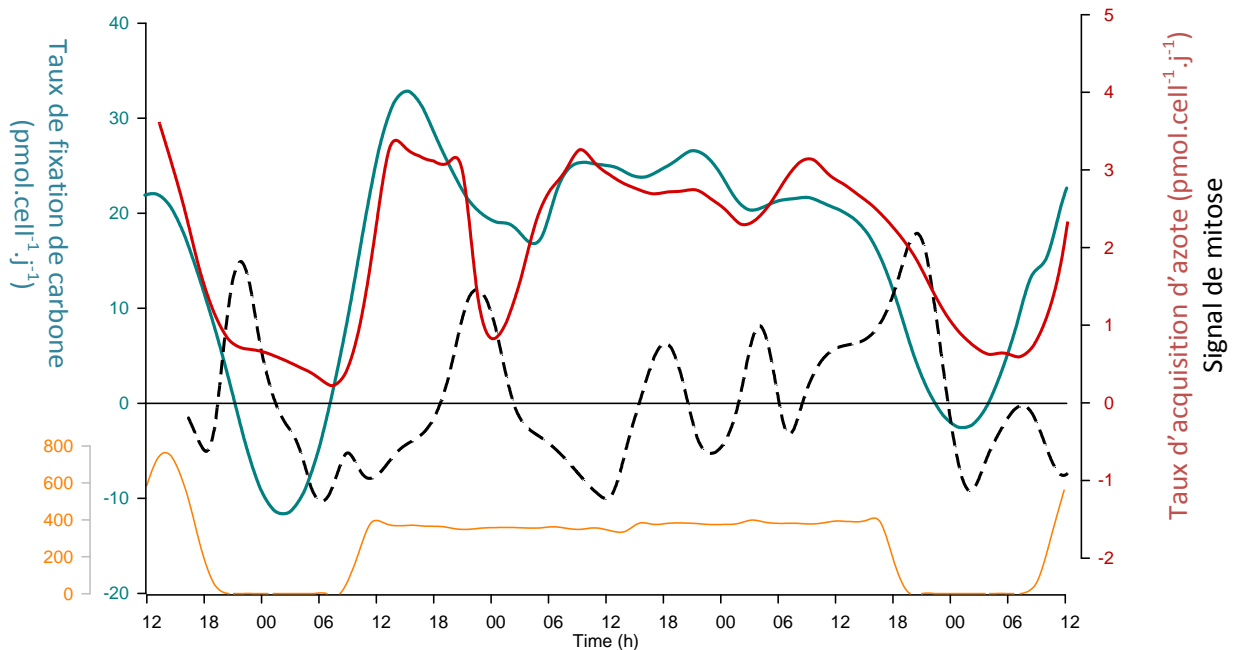


Figure 47. Taux d'acquisition d'azote calculé sur l'azote cellulaire ($\text{pmolN.j}^{-1}.\text{cell}^{-1}$), taux de fixation de carbone ($\text{pmolC.j}^{-1}.\text{cell}^{-1}$), signal de mitose et intensité lumineuse ($\mu\text{molQuanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) au cours de l'expérience CL.

→ Lors du passage en illumination continue, des oscillations du taux de division et du signal de mitose sont toujours observées (Figure précédente). Elles localisent des évènements majeurs de mitose au sein de la population qui coïncident avec des périodes de faible acquisition d'azote.

4. Effet du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote : conclusions

Nos expériences en lumière limitante renforcent l'observation effectuée dans l'expérience *témoin* qui soulignait que la majorité de l'azote est acquis de jour. Cependant, la cinétique d'acquisition d'azote en deuxième partie de journée est altérée par l'occurrence des évènements de mitose. Les expériences conduites avec limitation en azote ont mis en évidence que *T. weissflogii* pouvait acquérir cet élément indépendamment de la présence de lumière. Cependant, la cinétique de prise d'azote présente toujours des oscillations diurnes. Nous les expliquons par l'avancement des cellules dans leur cycle. Plus précisément, les périodes de prise d'azote réduite sont généralement concomitantes avec un évènement majeur de mitose dans la population. Les expériences conduites avec un cycle lumineux diurne suggèrent donc que l'acquisition d'azote est réduite pendant les phases de mitose, indépendamment de l'état de limitation azoté ou lumineux de la population.

Les observations effectuées lors du passage d'un cycle diurne à une illumination continue confirment que l'abaissement de la prise d'azote en fin de journée n'est pas lié au flux de photon. **Ces résultats mettent en évidence l'implication du cycle cellulaire dans le métabolisme de l'azote en suggérant que les processus mitotiques interrompent son acquisition.**

Dans le chapitre suivant, nous allons examiner ce qui planifie le déroulement du cycle cellulaire, et donc l'entrée en mitose des cellules.

Chapitre IV

Comment est régulé l'avancement du cycle cellulaire ?



Metronome, by avo43

IV. Régulation de l'avancement du cycle cellulaire

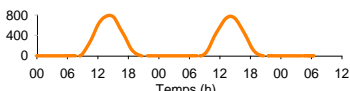
Le chapitre précédent a mis en évidence l'effet du cycle cellulaire sur le métabolisme de l'azote chez *Thalassiosira weissflogii*, notamment par une diminution de l'acquisition d'azote en période mitotique. L'objet de ce chapitre est d'examiner ce qui détermine la planification quotidienne du cycle cellulaire, notamment l'horaire de la mitose.

Les conditions environnementales, via le statut physiologique de la cellule, déterminent la vitesse d'avancement du cycle cellulaire (Cf. p38, Chisholm *et al.* 191986, Olson *et al.* 1986). D'autre part, la division cellulaire semble associée à l'existence d'une horloge interne chez de nombreuses espèces de microalgues (Cf. p40, Chisholm & Brand 1981). Ces deux aspects ont rarement été abordés dans un ensemble cohérent. Le but de ce chapitre est donc de démêler les effets des conditions environnementales et ceux d'une horloge interne, sur l'avancement du cycle cellulaire.

1. Avancement du cycle cellulaire en conditions non limitantes

Dans l'expérience *témoin*, la moyenne journalière du pourcentage de cellules en G1 (pG1) est de 56%, celle en S est de 4% et celle en G2/M de 40%. Sur 24h, les cellules sont donc majoritairement en G1 (Figure 48).

Tableau 8. Rappel des conditions de l'expérience "*témoin*"

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
Témoin	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

A l'échelle diurne, la population est majoritairement en G1 la nuit, et en G2/M le jour (Figure 48). Le pS augmente au cours de la nuit pour atteindre un maximum à la fin de la phase obscure, mais il n'atteint jamais une valeur supérieure à 5%. Ce niveau constamment faible peut résulter de la courte durée de cette phase, associée à l'incomplète synchronisation de la population. En effet, si une phase de courte durée n'a pas lieu exactement en même temps pour toutes les cellules, nous ne l'identifierons pas clairement au niveau de la population. Nous pouvons reconstituer le déroulement d'un cycle cellulaire moyen représentatif de la population synchronisée. **La plupart des individus sont en G1 en début de nuit, en S en fin de nuit ou à l'aube, et en G2/M le jour.** Comme détaillé précédemment, la méthode de marquage d'ADN ne permet pas de différencier les phases G2 et M

puisque'il n'y a pas de variation du contenu cellulaire en ADN entre ces deux phases. Cependant, en supposant que la phase de mitose soit de courte durée, la transition entre la phase G2/M et la phase G1 se situe entre 16 et 23h (Figure 48). Cet intervalle ne correspond pas à la durée de la mitose pour chaque cellule, mais à une fenêtre au cours de laquelle une grande partie de la population se situe dans cette phase. Nous pouvons noter que les deux cultures suivies simultanément et exposées aux mêmes conditions révèlent des réponses très similaires (Figure 48).

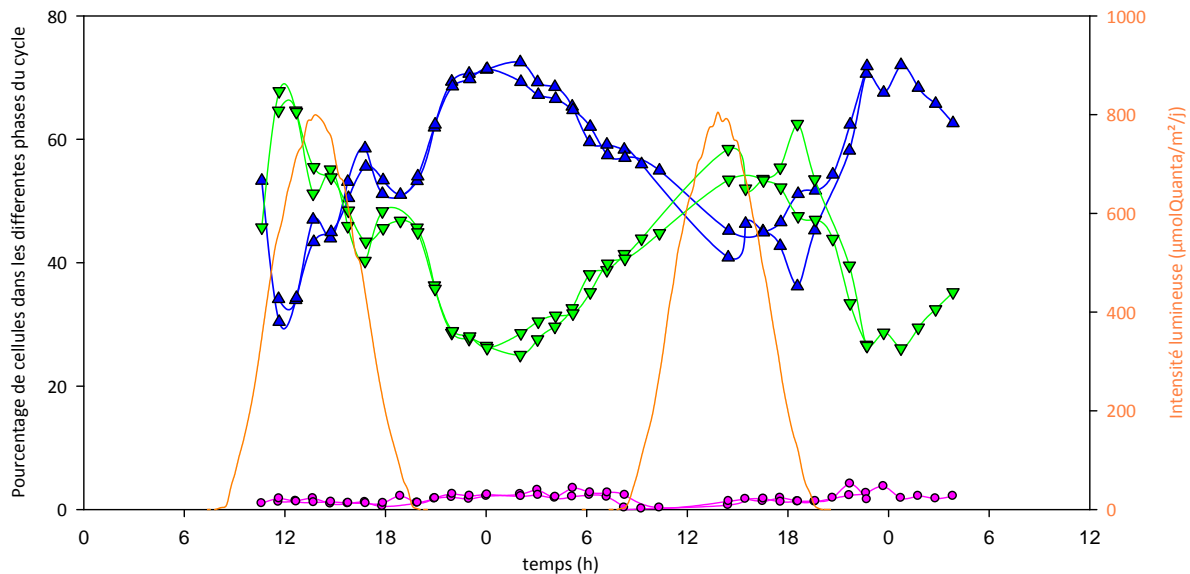


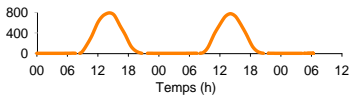
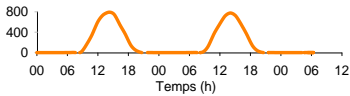
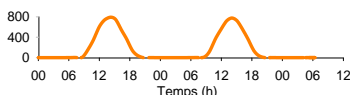
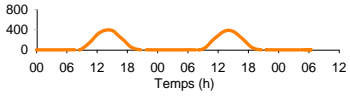
Figure 48. Evolution du pourcentage de cellules en phase G1 (bleu), S (rose) et G2/M (vert) au cours de l'expérience *témoin*. Les données des deux bioréacteurs répliqués sont représentées. Les phases G2 et M ne sont pas discernables. Le signal lumineux diurne est indiqué en orange.

2. Effet de la disponibilité en azote, ou du quota en azote

Dans la littérature, les espèces de microalgues testées montrent communément un point de blocage en G1 lié à la disponibilité en azote, qui se caractérise par une augmentation du pourcentage de cellules en G1 (Olson *et al* 1986, Olson & Chisholm 1986, Vaultot *et al.* 1987). Deux hypothèses sur ce contrôle peuvent être envisagées : soit un point de blocage entre G1 et S dont le passage dépend du statut azoté, soit un allongement plus ou moins important de cette phase au sein duquel la vitesse d'avancement dépend des mêmes facteurs.

Dans le but de tester l'effet de l'azote sur la régulation du cycle cellulaire, deux types de d'approches expérimentales peuvent être envisagés en culture continue. Soit une limitation de la croissance, par la diminution du taux de dilution (expériences *Nlim*). Soit une carence, par un renouvellement de la culture avec un milieu privé de substrat azoté (expérience *Nstarv*).

Tableau 9. Rappel des conditions des expériences "*témoin*", "*Nlim1*", "*Nlim2*" et "*Nstarv*"

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
<i>Témoin</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Nlim1</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 0,69/j μ s'ajuste sur D (chemostat) Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Nlim2</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 0,5/j μ s'ajuste sur D (chemostat) Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Nstarv</i>	Max = 400 Dose = 8,5 	D = 0,9/j Sin = 0 $\mu\text{mol}/\text{L}$

2.1. Avancement en conditions de limitation par l'azote

Les conditions des expériences *Nlim* sont détaillées dans le chapitre précédent (p85) et rappelées dans le tableau ci-dessus.

Au cours du premier jour de limitation azotée, les pourcentages des cellules en G1 (pG1) et en G2 (pG2) diminuent et augmentent respectivement de 12 points (Figure 49), de sorte que le compartiment S (pS) ne montre pas d'évolution. La diminution du pG1 observée après l'instauration de la limitation azotée est en opposition avec des résultats de la littérature (Vaulot 1994). Cependant, le pG1 augmente ensuite pour dépasser de 10 points la valeur *témoin* (Figure 49) au jour 10, rejoignant les observations faites dans la littérature.

La phase du signal du pG1 et pG2 est également affectée par la limitation azotée. Alors que le maximum du pG2 intervient durant la phase claire des jours 0 et 1, il est décalé à la fin de la nuit le jour 10. Ce décalage suggère que le blocage en G1 dû à la limitation azotée provoque un allongement du cycle cellulaire.

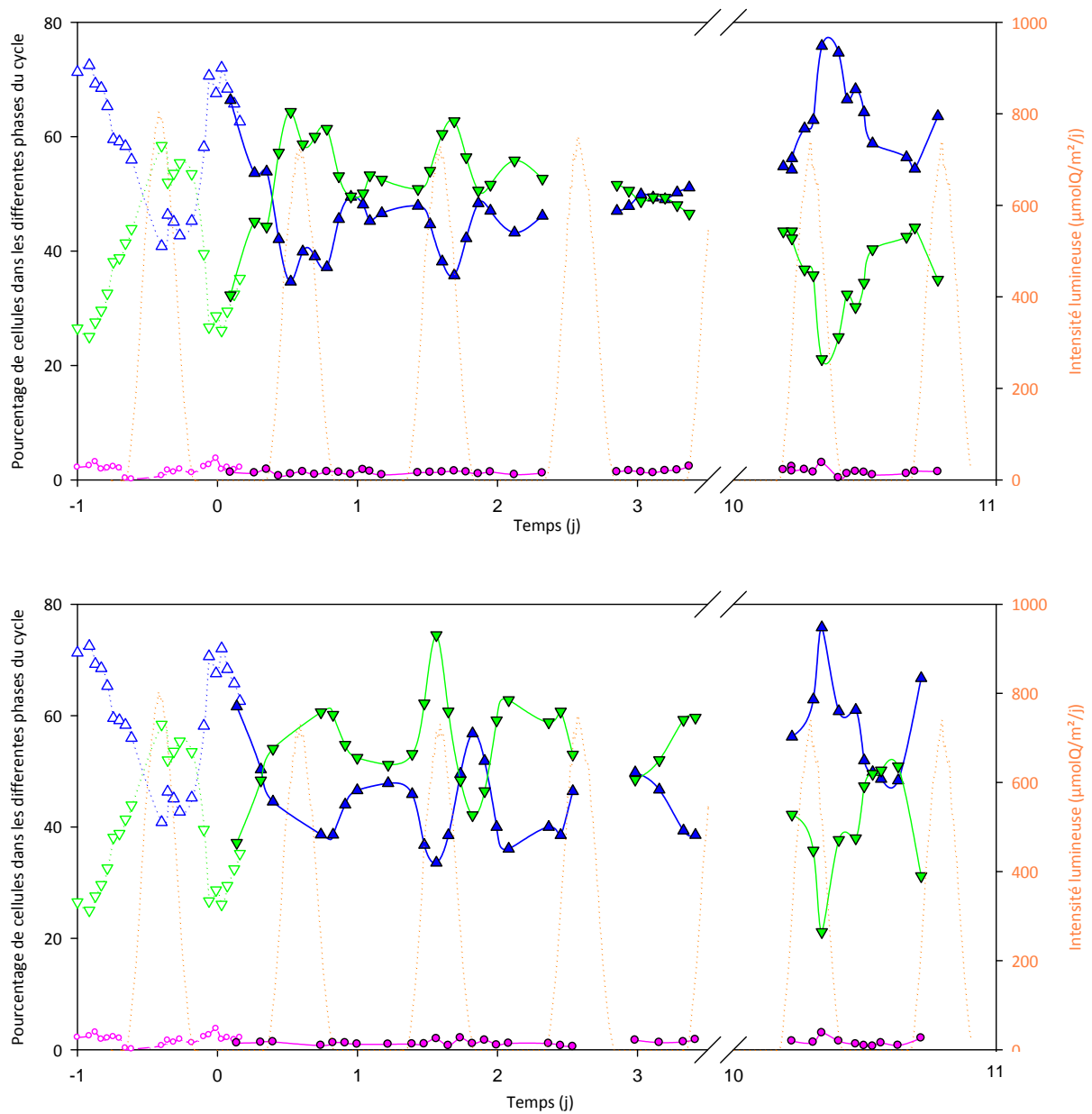


Figure 49. Evolution du pourcentage de cellules en phase G1 (bleu), S (rose) et G2/M (vert) au cours de l'expérience *Nlim1* (en haut) et *Nlim2* (en bas). Les données de l'expérience *témoin* sont rappelées en lignes pointillées et marqueurs vides. Noter le saut temporel entre les jours 3 et 10. Les phases G2 et M ne sont pas discernables. Le signal lumineux diurne est rappelé en orange pointillé.

2.2. Avancement en conditions de carence en azote

Dans l'expérience *Nstarv*, une culture de *Thalassiosira weissflogii* non limitée ($D=0,9 \text{ j}^{-1}$) pendant 27 jours a été soumise à une carence totale en azote. Au 28^e jour à 12h (jour 0 sur la figure ci-dessous), le milieu de renouvellement est dépourvu d'azote et le taux de dilution reste inchangé. Les nitrates résiduels dans le bioréacteur s'épuisent en quelques heures, puis le taux de division et la densité cellulaires chutent à leur tours 24h plus tard..

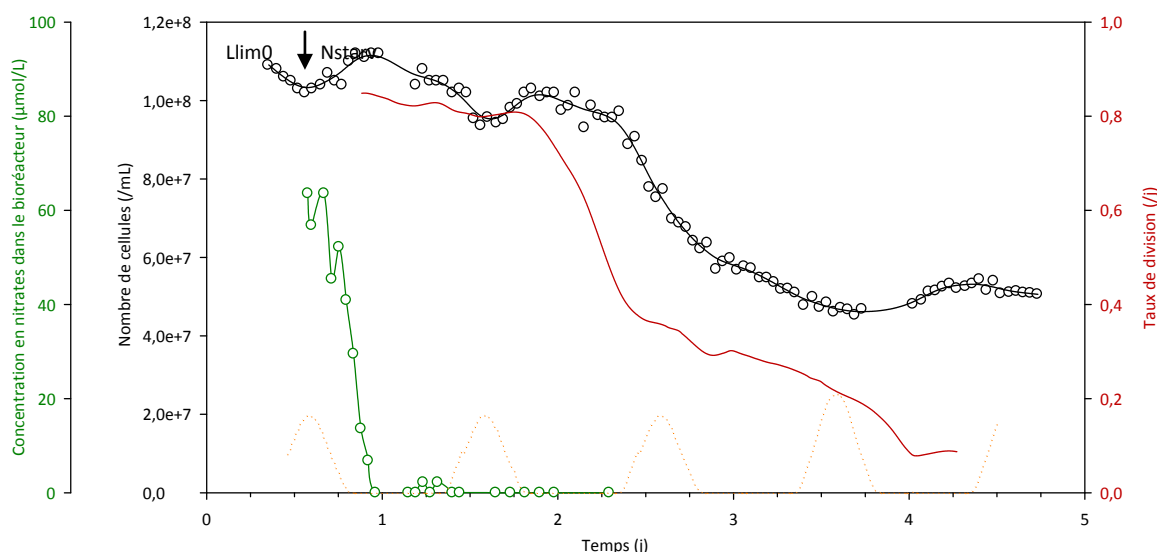


Figure 50. Evolution du nombre de cellules, du **taux de division moyenné sur 24h, et de la **concentration extracellulaire en nitrates** au cours de l'expérience *Nstarv*.** La flèche symbolise la fin de l'apport d'azote à j0,5. La population est auparavant en condition non limitante d'azote. Le cycle lumineux diurne est rappelé en orange pointillé.

Au cours du premier jour sans apport d'azote, le comportement du pG1 reste inchangé par rapport aux conditions non limitantes (Figure 51). L'évènement principal de mitose a toujours lieu en fin de journée (Figure 51). Ensuite, le pG1 augmente jusqu'à dépasser 95%, 24h après l'épuisement des nitrates dans la culture. Des cycles sont encore visibles au cours des deux jours suivants, mais le pG1 reste proche des 100% et l'amplitude des variations s'atténue. Deux évènements de mitose sont visibles à l'aube et au crépuscule du deuxième jour, comme en conditions non limitantes, à la différence que l'évènement du soir est beaucoup plus faible. Ensuite, l'occurrence des évènements de mitose, de plus faibles intensités, ne semble plus liée au signal lumineux diurne.

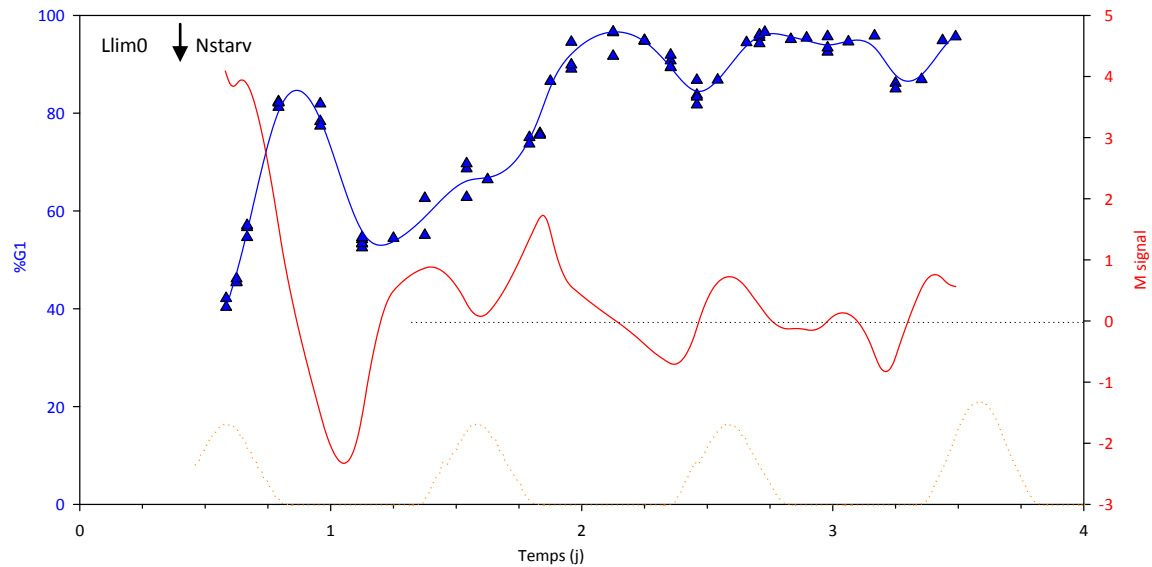


Figure 51. Evolution pourcentage de cellules en phase G1 et du signal de mitose au cours de l'expérience *Nstarv*. La flèche symbolise la fin de l'apport d'azote à j0,5. La population est auparavant en condition non limitante d'azote. Le cycle lumineux diurne est rappelé en orange pointillé. Le cycle lumineux diurne est rappelé en orange pointillé.

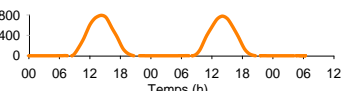
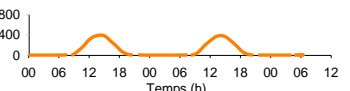
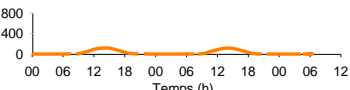
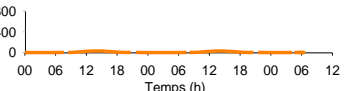
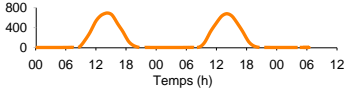
→ Ainsi, une limitation azotée semble agir différemment sur le cycle cellulaire suivant l'échelle de temps considérée. A court terme, elle conduit à une augmentation de la proportion de cellules en G2 et à une forte désynchronisation de la population. Quelques jours après, les cellules se bloquent en G1, situation plus conforme avec les observations relevées dans la littérature. La durée de la phase G1 s'en trouvant allongée, la durée du cycle s'accroît, semblant décaler au fil des jours l'entrée en mitose de la population synchronisée. Enfin, une carence en azote provoque en peu de temps le blocage des cellules dans la phase G1 de leur cycle.

3. Effet de la dose de lumière

En plus du contrôle exercé par le statut nutritionnel, le cycle cellulaire de *Thalassiosira weissflogii* comprend également un ou plusieurs points de blocage dépendant du statut énergétique, c.à.d. de la dose de lumière reçue au cours des heures précédentes. L'existence d'un point de blocage en G1 a été démontrée chez toutes les microalgues testées et certaines espèces, telles les diatomées, en possèdent un autre en G2 (Spudich & Sager 1980, Olson & Chisholm 1986, Vaultot *et al.* 1986, Yee & Bartholomew 1988, Vaultot 1994, Jacquet *et al.* 2001). Nous nous proposons dans les expériences suivantes de tester l'effet de la dose de lumière, sur l'avancement du cycle cellulaire de *Thalassiosira weissflogii* à court et moyen termes.

Les expériences ont été réalisées en cultures continues non limitées par l'azote, avec un cycle lumineux diurne, et des doses de lumière comprises entre 0,6 à 17 molquanta/m².j⁻¹ (Tableau ci-dessous).

Tableau 10. Rappel des conditions des expériences "témoin", "Llim0", "Llim1", "Llim2" et "pré-ML"

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
<i>Témoin</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Llim0</i>	Max = 400 Dose = 8,5 	D = 0,9/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Llim1</i>	Max = 120 Dose = 4,2 	D = 0,5/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Llim2</i>	Max = 20 Dose = 0,6 	D = 0,03-0,5/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Pré-ML</i>	Max = 700 Dose = 15 	D = 1,4/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

3.1. Effet d'une réduction modérée de la dose de lumière

Etabli à 56% en condition *témoin* (17 molphotons.m⁻².j⁻¹), le pG1 journalier moyen diminue à 50% lorsque la dose de lumière est réduite de 15% (conditions *pré-ML*, Figure 52 haut). Une réduction du flux de photon plus prononcée de 35 et 80% (conditions *Llim0* et *Llim1*) n'a pas d'effet plus marqué sur le niveau moyen des cellules dans les différentes phases du cycle (Figure 52 bas et Figure 53 haut).

A l'échelle diurne, les variations sont conservées en phase (Figure 52 et Figure 53 haut). Seules leurs amplitudes sont réduites de 5 à 20 points à cause de la désynchronisation partielle de la population, provoquée par la diminution de la dose de lumière.

Globalement, le cycle cellulaire reste donc conservé pour une gamme d'éclairement compris entre 5 et 15 molQuanta.m⁻².j⁻¹.

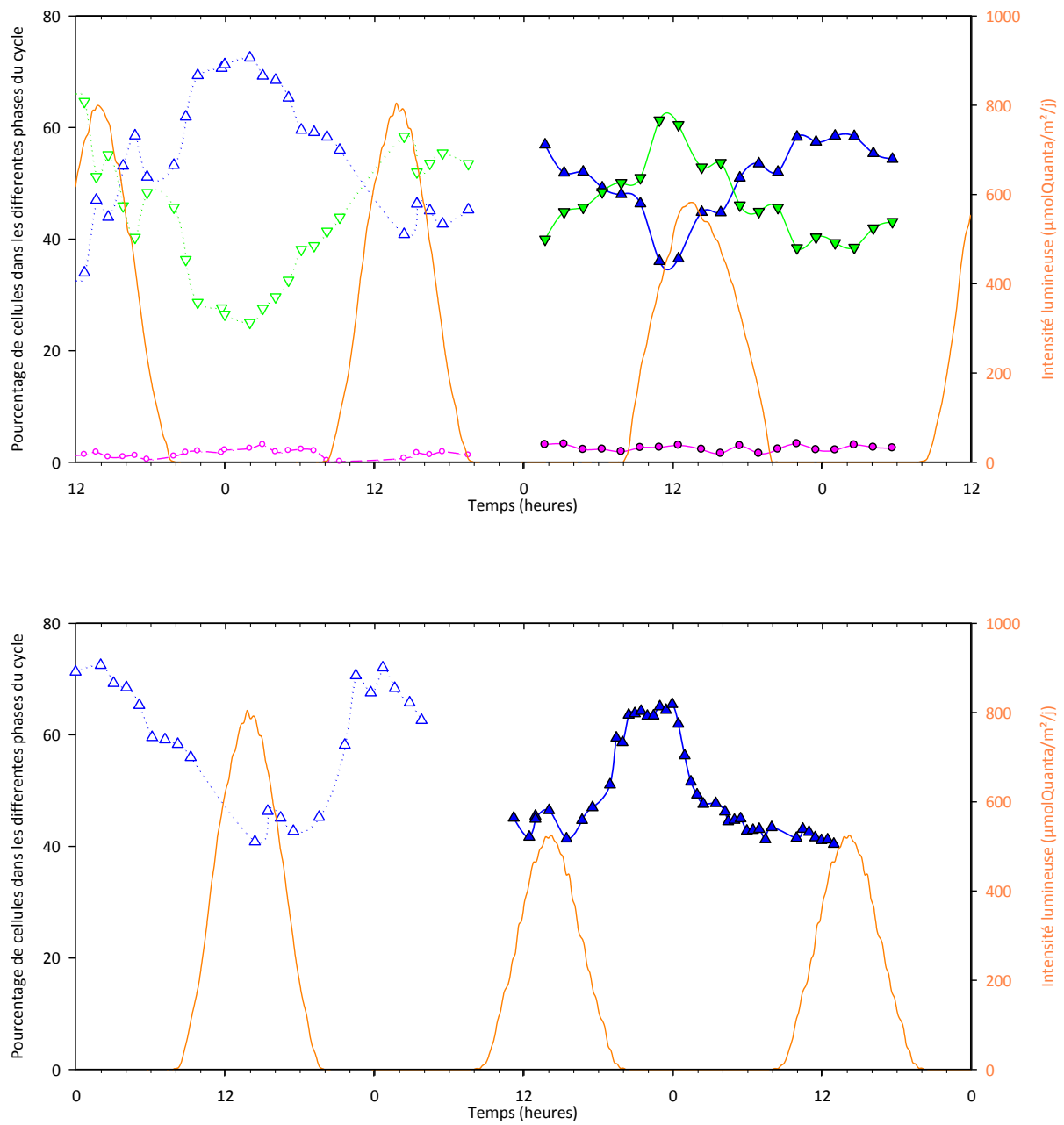


Figure 52. Evolution du pourcentage de cellules en phase G1 (bleu), S (rose) et G2/M (vert) au cours de l'expérience *préML* ($15,1 \text{ molQuanta.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) en haut, et *LimO* ($11,8 \text{ molQuanta.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) en bas. Les données de l'expérience *témoin* sont rappelées en lignes pointillées et marqueurs vides. Les phases G2 et M ne sont pas discernables. L'intensité lumineuse est indiquée en orange.

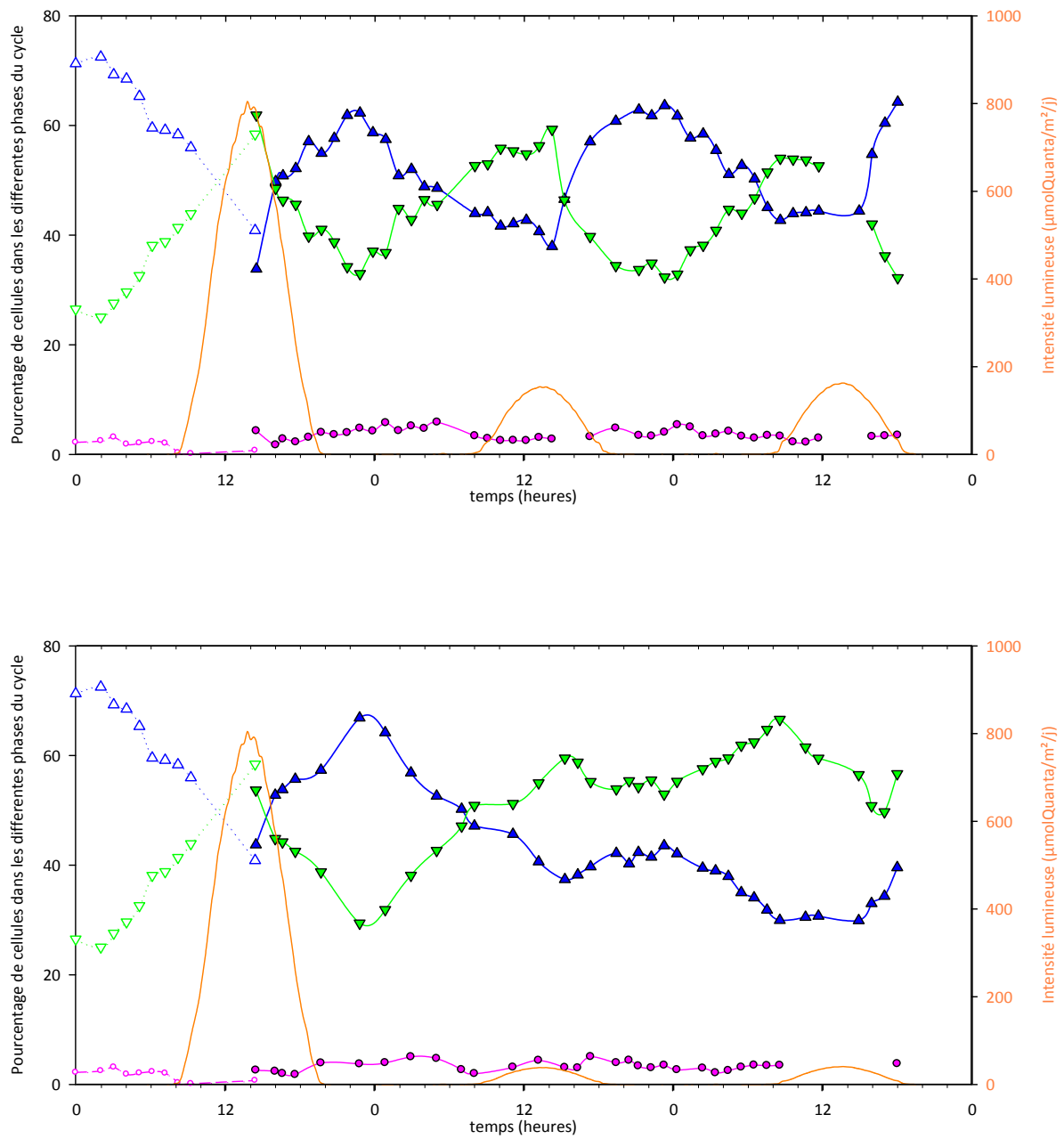


Figure 53. Evolution du pourcentage de cellules en phase G1 (bleu), S (rose) et G2/M (vert) au cours de l'expérience $Llim1$ ($4,3\text{molQuanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$) en haut, et $Llim2$ ($0,6\text{molQuanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$) en bas. Les données de l'expérience *témoin* sont rappelées en lignes pointillées et marqueurs vides. L'intensité lumineuse est indiquée en orange.

3.2. Effet d'une forte diminution de la dose de lumière

Pour une dose de lumière très réduite (expérience *Llim2*), le comportement du cycle cellulaire est affecté. Une réduction de 95% du flux de photon ($0,6 \text{ molQuanta.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) entraîne en deux jours une chute de 36% de la moyenne journalière du pG1 (Figure 53 bas, page précédente). Le pG2 augmente inversement et le pS n'est pas sensiblement modifié. Ces conditions de limitation lumineuse n'ayant pas permis de maintenir la population durablement, nous ne pouvons garantir que ces observations correspondent à un état d'équilibre.

→ Ainsi, une diminution du flux de photon ne provoque pas de bouleversements majeurs du cycle cellulaire de *Thalassiosira weissflogii* tant que la dose de lumière journalière reste supérieure à $4 \text{ molquanta.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$. Une diminution extrême de la dose (ici $< 0,5 \text{ mol.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) provoque cependant un blocage des cellules en phase G2 et l'arrêt de la croissance.

4. Implication d'une horloge interne

Le fait que des limitations nutritionnelle ou énergétique provoque l'allongement d'une ou plusieurs phases du cycle cellulaire a un impact sur sa durée globale, et donc sur le temps de génération de la population. Cette augmentation devrait décaler l'événement de mitose de quelques heures au fil des jours. Qu'en est-il réellement ?

4.1. Conservation du timing de la division en environnement variable

Tant que la population est synchronisée, des événements de division majeurs apparaissent. Ils sont restreints au sein de fenêtres temporelles qui perdurent au fil des jours. En effet, quelles que soient les conditions de croissance, nos expériences montrent l'existence d'un événement majeur centré autour de 18-20h, et un autre de plus faible intensité est généralement visible à la fin de la nuit (flèches Figure 54). Il importe de noter ici que la planification de la division s'avère indépendante du temps de génération moyen de la population puisque l'entrée en mitose n'est pas retardée lorsque celui-ci augmente. Ces intervalles sont cohérents avec l'étude de Chisholm & Costello (1980) qui reportait deux pics majeurs de divisions par jour chez la même espèce. **Nous suggérons d'expliquer ces observations par la présence d'un oscillateur interne (non lié aux conditions environnementales) qui rythme le cycle cellulaire en restreignant l'entrée en mitose des cellules à ces fenêtres temporelles.**

Edmunds (1966) a observé des pics de division quotidiens chez des populations dont le temps de génération était supérieur à 1 jour. Notant que ces pics avaient toujours lieu au sein d'une même fenêtre temporelle, il suggéra: "*There is only a limited period of the 24h circadian time [...] during which cell division may occur, if it can occur at all*". Cette observation s'inscrit dans le concept du "*gating*" (Sweeney & Hastings 58, Pittendrigh 1960), métaphorisant la planification de la division par une porte dont l'ouverture serait cadencée par une horloge interne, et que les cellules franchiraient ou non en fonction de leurs conditions physiologiques.

Notons toutefois que si de nombreux auteurs ont reliés la division cellulaire à une horloge interne chez de nombreuses espèces de microalgues (Chisholm & Brandt 1981, Goto & Johnson 1995, Brunelle *et al.* 2007) et même de macroalgues (Titlyanov *et al.* 1996), d'autres ont mis en évidence un contrôle par le signal lumineux diurne seul (Spudich & Sager 1980, Kuwano *et al.* 2008).

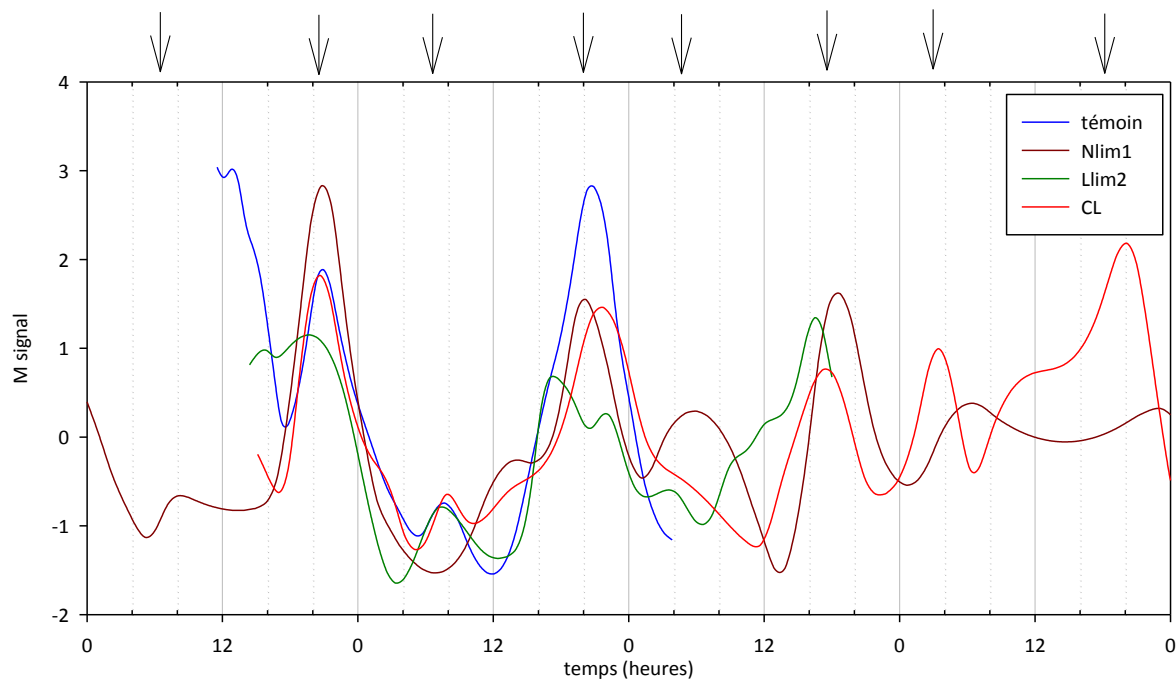


Figure 54. Superposition des signaux de mitose obtenus avec des conditions différentes. *Témoin* : conditions non limitantes, $\mu=1,4.j^{-1}$. *Nlim* : diminution de l'apport en azote (instauré au 2^e jour à 10h), $\mu=0,7-1,4.j^{-1}$. *Llim* : diminution de la dose de lumière (instaurée au 2^e jour à 8h), $\mu=0,5-1,4.j^{-1}$. *CL* : passage en lumière continue (au 2^e jour à 12h), $\mu=1,4-2,1.j^{-1}$.

4.2. Conservation sous illumination continue des pics de division d'une population à croissance ultradienne

La restriction temporelle de la division cellulaire (*gating*) est une extension de l'hypothèse du contrôle de la division cellulaire par une horloge interne dont l'action est communément mise en évidence par la conservation d'oscillations diurnes du taux de division lors d'un passage d'un

éclairage cyclique à un régime continu (Goto & Johnson 1995, Mittag 2001). Les résultats de notre expérience *CL* montrent justement que la dynamique du cycle cellulaire et du taux de division en cycle diurne perdurent après un passage en lumière continue (Figures 45 et 46 p95). Les pics du taux de division et du signal de mitose surviennent toujours au sein des mêmes fenêtres temporelles, c'est-à-dire en fin de journée et en fin de nuit. Alors que le pic de fin de journée est prédominant dans l'expérience *témoin*, notons que les deux pics sont ici d'une intensité comparable. Cette observation peut résulter de l'augmentation du taux de division ($2,1 \text{ j}^{-1}$), qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules se divisant au moins deux fois par jour. Notons également que, le taux de division est toujours largement supérieur à zéro, signifiant qu'une partie des divisions se réalise en dehors de ces deux fenêtres temporelles.

La conservation des oscillations du taux de division lors du passage d'un éclairage cyclique à un éclairage continu a largement été mise en évidence pour des populations infradiennes¹ depuis les années 50 (Sweeney & Hasting 1958, Edmunds 1966, Goto & Johnson 1995). Cependant, le cas des populations à croissance ultradienne², c'est-à-dire se divisant plus d'une fois par jour, apparaît plus complexe (Sweeney 1987). La fonction d'une horloge interne d'une période de 24h chez des individus se divisant plus d'une fois au cours de cet intervalle n'est pas évidente (Suzuki & Johnson 2001). L'absence d'horloge interne chez les procaryotes, se divisant généralement plus d'une fois par jour, fut un dogme pendant de nombreuses années (Johnson *et al.* 1996). D'ailleurs, une loi empirique, la « *circadian infradian rule* », établissait avant les années 1980 que le contrôle d'une horloge interne sur le cycle cellulaire ne s'exprimait que sur des populations à croissance infradienne (Ehret & Wille 1970). Depuis, un rythme circadien a été mis en évidence, entre autre sur la fixation d'azote de cyanobactéries (Grobbelaar *et al.* 1986, Chen *et al.* 1996).

Les eucaryotes sont supposés être incapable de maintenir un rythme interne circadien lorsque la croissance est ultradienne (Prezelin 1992, Suzuki & Johnson 2001). Or, nos observations vont à l'encontre de ce postulat, puisque nous observons une conservation des oscillations du cycle cellulaire et de l'acquisition d'azote dans l'expérience *CL* où la croissance est largement ultradienne. Nous observons également la conservation du contenu pigmentaire par unité de cellule et de volume de culture (Figure 55 ci-dessous), ce qui est cohérent avec l'hypothèse du contrôle du pool pigmentaire par une horloge interne (Ragni & Ribera d'Alcala 2007). Nos résultats suggèrent donc qu'une horloge interne peut maintenir le rythme du cycle cellulaire sur une période circadienne, même au sein d'une population eucaryote à croissance ultradienne.

¹ population ou croissance infradienne : dont le temps de génération est supérieur à 1j.

² population ou croissance ultradienne : dont le temps de génération est inférieur à 1j.

Il faut cependant nuancer ces observations par le fait que ces oscillations n'ont été suivies que pendant 50h en régime de lumière continue alors que certaines espèces montrent une conservation du rythme circadien pendant plusieurs semaines (Roenneberg & Morse 1993, Suzuki & Johnson 2001). De plus, nous n'avons pas testé l'effet de la température sur la conservation de ces oscillations, ce qui est l'autre caractéristique du contrôle par une horloge interne (McClung 2000).

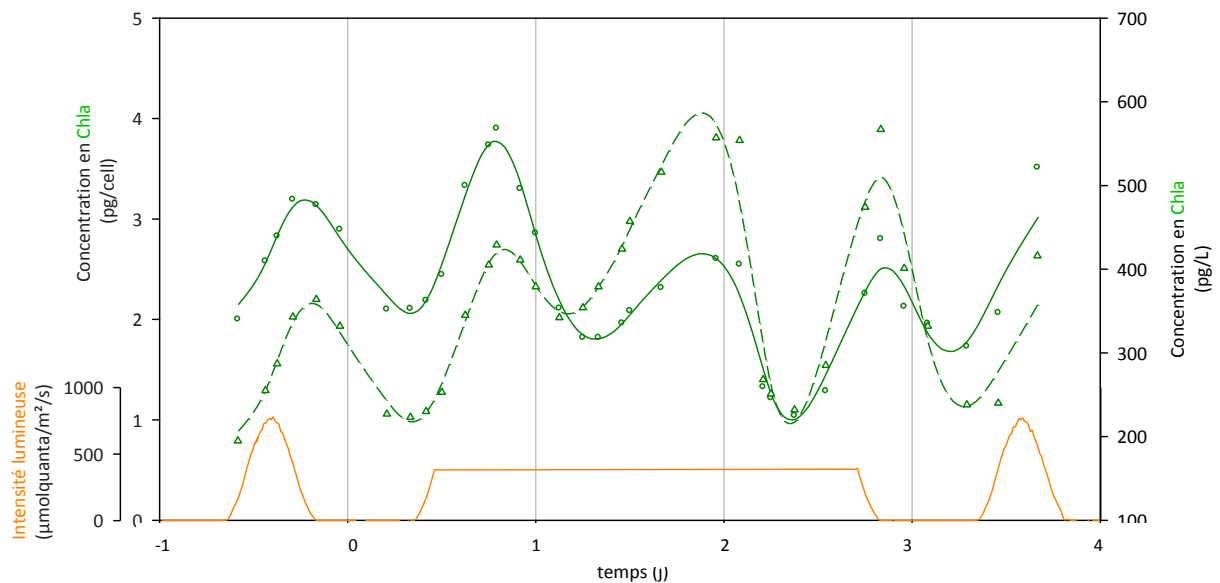


Figure 55. Concentration en Chla par unité de cellule (cercles et trait plein) et de volume de culture (triangles et courbe tiretée) au cours du passage en lumière continue (expérience CL).

4.3. Deux évènements, deux portes, deux ouvertures ?

L'existence de deux évènements majeurs de division/mitose quotidiens, séparés d'environ 12h (Figure 54), appelle différentes hypothèses. Soit il existe deux populations distinctes dont l'horaire d'ouverture de la porte est différent, soit deux ouvertures sont possibles au sein d'une unique population. Dans le cas d'une croissance infradienne, la première hypothèse sous-entend l'existence de deux sous-populations ayant des cycles cellulaires en opposition de phase, dont la mitose se déroule pour l'une en fin de journée et pour l'autre en fin de nuit. La seconde hypothèse suggère l'existence d'une seule population, dont la majeure partie se divise en fin de journée. Chaque jour, les cellules qui ne pourraient franchir la porte lors de sa première ouverture (car leur statut physiologique ne le permet pas) profiteraient de la seconde pour se diviser.

Dans le cas d'une croissance ultradienne, la seconde hypothèse semble plus crédible. Prenons comme exemple l'expérience *témoin* où la population se divise en moyenne deux fois par

jour. Les deux événements quotidiens semblent alors davantage liés à une seule population se divisant deux fois par jour.

→ Ainsi, l'hypothèse du "*gating*" est cohérente avec nos résultats à condition que le concept soit adapté en modifiant la fréquence d'ouverture de la porte (deux fois par jour) et en élargissant les conditions d'application (quelque soit le taux de croissance).

4.4. Comment l'horloge interne peut-elle influencer le cycle cellulaire ?

Si le contrôle de la division cellulaire par une horloge interne est visible au niveau macroscopique, son déterminisme est moléculaire. Comme expliqué en introduction (Encadré 3 p41), l'horloge interne est le fruit d'une alternance auto-entretenu entre expression et répression de gènes. La preuve en est que la mutation des gènes impliqués dans le rythme interne de *Chlamydomonas reinhardtii* provoque l'allongement de son cycle cellulaire (Goto & Johnson 1995). L'influence d'une horloge interne sur le cycle cellulaire est envisagée sous la forme d'un contrôle temporel (Edmunds & Adams 1981, Sweeney 1982) qui peut se concevoir par une phase de « pause » dont la sortie ne serait autorisée qu'à intervalles réguliers (Klevecz 1976). Cette hypothèse serait en mesure d'expliquer les deux pics de taux de division et de signal de mitose espacés d'environ 12h, généralement observés dans nos résultats (Figure 54).

5. Conclusions sur le contrôle de l'avancement du cycle cellulaire

En conclusion, nos résultats suggèrent un double contrôle des conditions de croissance et d'une horloge interne sur le déroulement du cycle cellulaire. Les conditions nutritionnelles ont un effet différent à court et moyen terme. Dès que les cellules sont limitées, on assiste à une forte désynchronisation de la population et à une diminution du pG1. Au contraire, quelques jours plus tard les cellules sont partiellement (dans le cas d'une limitation) ou totalement (dans le cas d'une carence) bloquées en phase G1. Le pG1 moyen de la population est d'ailleurs proportionnel au degré de limitation par l'azote comme le montre la partie droite de la Figure 56. La dose de lumière semble avoir un effet inverse sur le déroulement de cycle cellulaire, puisqu'une forte diminution du flux de photon provoque une diminution du pG1 moyen de la population chez *Thalassiosira weissflogii* (Figure 56 gauche). Nous noterons cependant que l'effet sur le cycle cellulaire est silencieux sur une large gamme de dose de lumière, suggérant davantage un effet de seuil plutôt qu'un lien proportionnel.

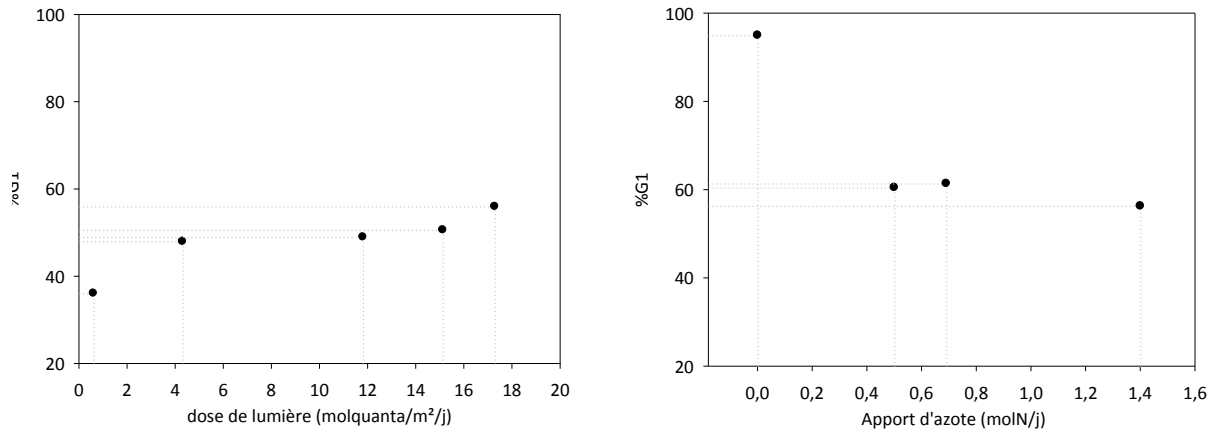
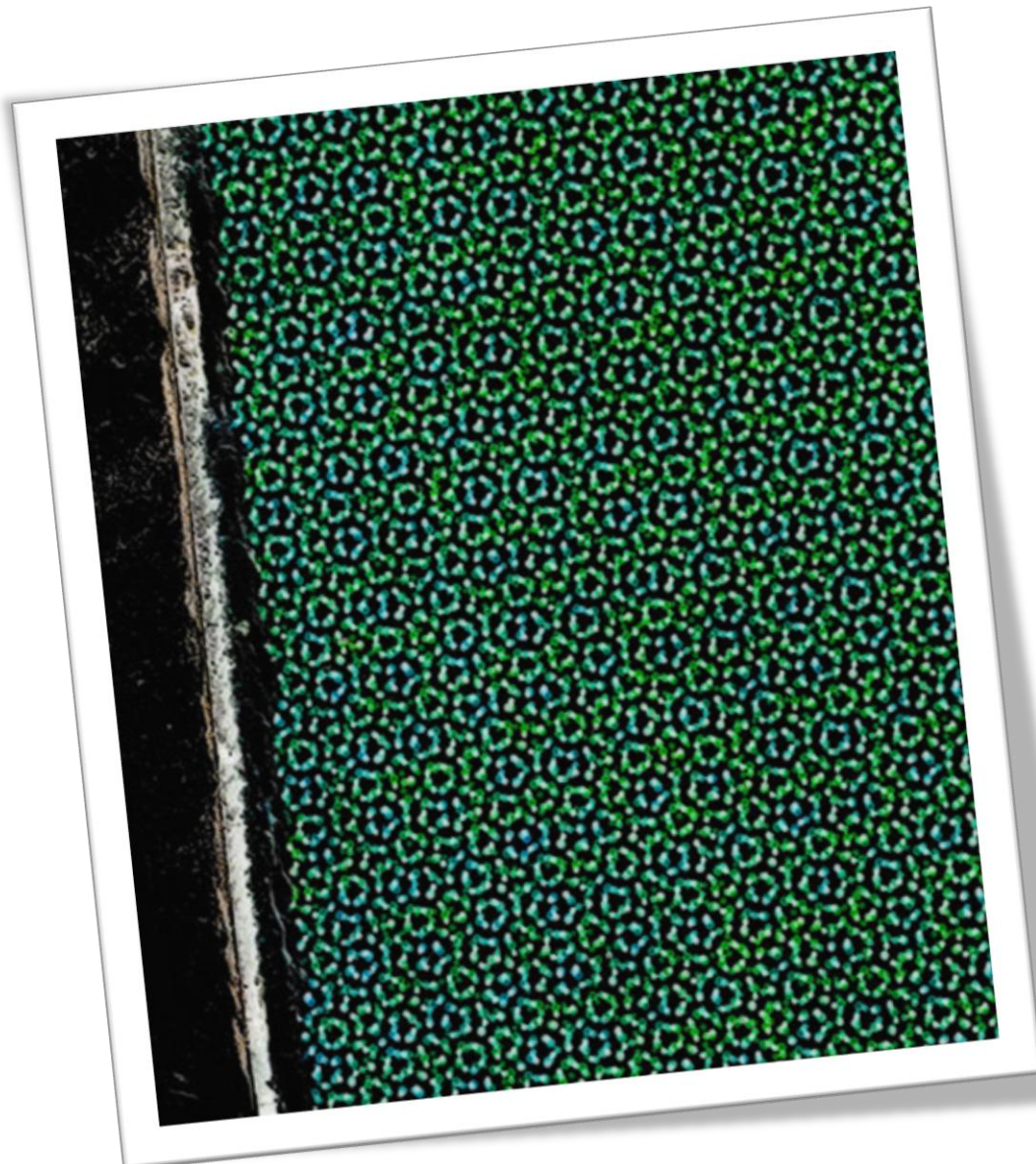


Figure 56. Pourcentage de cellules en phase G1 moyenné sur 24h en fonction de la dose de lumière (à gauche) et de l'apport d'azote (à droite).

Malgré l'impact des conditions de croissance sur la durée du cycle cellulaire, l'horaire des événements majeurs de division est conservé, suggérant l'existence d'un oscillateur indépendant. **Selon notre hypothèse, les paramètres environnementaux jouent un rôle sur chaque cellule en allongeant individuellement leur cycle cellulaire et l'horloge interne fixe un intervalle au cours duquel la division est possible.** Dans cet intervalle, la cellule se divise si ses conditions physiologiques le permettent sans quoi elle attend l'intervalle suivant. Cette hypothèse satisfait les deux observations, *a priori* opposables, de l'allongement du temps de génération (qui s'applique à chaque cellule) et de la conservation des horaires de division (observée au niveau de la population).

Chapitre V

Dans quelle mesure les propriétés individuelles peuvent avoir des conséquences macroscopiques ?



Distant green, by davespertine

V. Conséquences macroscopiques des propriétés individuelles

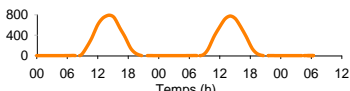
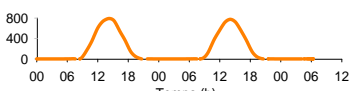
Nous avons défini dans le chapitre précédent que l'avancement du cycle cellulaire est contrôlé par les paramètres environnementaux et par une horloge interne. Ainsi, l'entraînement du cycle cellulaire par un signal externe fluctuant, tel que la variation diurne de lumière ou de disponibilité en nutriments, peut provoquer la synchronisation de la population. Par synchronisation, nous entendons l'avancement en parallèle du cycle cellulaire de différents individus et donc l'occurrence synchrone de la division. Nous le verrons, ce phénomène peut ne concerner qu'une partie de la population. Dès que le cycle cellulaire d'au moins une partie de la population avance en parallèle, la synchronisation confère à la population les propriétés individuelles des cellules qui la constituent. Ainsi, des caractéristiques individuelles telles que l'opposition entre la phase de mitose et l'acquisition d'azote peuvent avoir des conséquences macroscopiques sur les flux de matière au niveau de la population. Cet impact populationnel sera d'autant plus fort que la proportion de cellules qui procèdent en mitose en même temps est grande.

Nous avons précédemment fait l'hypothèse que l'instauration de conditions défavorables à la croissance mettait en valeur les différences interindividuelles. La capacité d'achever un cycle entre deux « ouvertures de portes » est fonction des caractéristiques propres de chaque cellule. Nous allons maintenant détailler l'impact d'une limitation nutritionnelle ou énergétique, et celui d'une modification du signal lumineux, sur la synchronisation d'une population. Le degré de synchronisation d'une population peut se quantifier en différents termes. D'une part, l'amplitude de variation du pG1 est proportionnelle au nombre de cellules avançant en parallèle dans le cycle. D'autre part, l'intensité des pics du taux de division ainsi que leur largeur permettent de rendre compte de la synchronicité des événements de division dans une population. Comparons donc ces variables en fonctions des conditions de croissance.

1. Effets d'une limitation nutritionnelle ou énergétique sur la synchronisation

1.1. Effet d'une limitation de la croissance par l'azote

Tableau 11. Rappel des conditions des expériences "Témoin" et "Nlim1".

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
<i>Témoin</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
<i>Nlim1</i>	Max = 800 Dose = 17 	D = 0,69/j μ s'ajuste sur D (chemostat) Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

Reprenons les données des expériences *Nlim* dans lesquelles la diminution du taux de dilution a causé une limitation de la croissance par l'azote (Tableau 11). Nous avons suivi le nombre de cellules et donc le taux de division pendant 15 jours après l'instauration des nouvelles conditions (Figure 57).

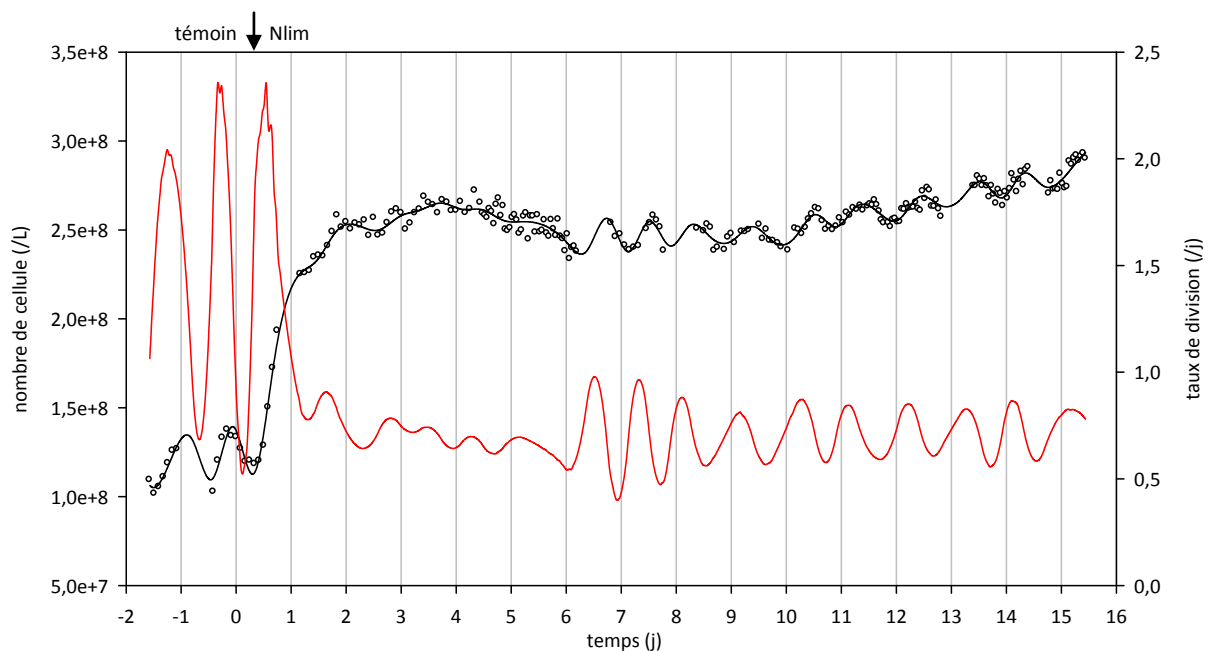


Figure 57. Nombre de cellules (en noir, points = mesures, courbe = lissage) **et taux de division** (en rouge) **au cours de l'expérience Nlim1**. La flèche symbolise la diminution du taux de dilution de $1,4 \cdot \text{j}^{-1}$ à $0,69 \cdot \text{j}^{-1}$ à $(j0,2)$. Les trous de données sont dus à des défaillances techniques. Les données étant très bruitées, les paramètres de lissage choisis ne permettent d'identifier qu'un pic par jour. Chaque trait vertical symbolise minuit.

1.1.1. Effet à court terme

Dès l'instauration des nouvelles conditions, le comportement du taux de division cesse de présenter le pic majeur de fin de journée. Le signal de dénombrement cellulaire est très bruité et ne permet plus d'identifier des événements de divisions synchrones (Figure 57). Le signal de mitose permet encore d'identifier à l'aube et au crépuscule des événements de mitose au niveau de la population (Figure 57) mais ceux-ci sont toutefois de faible intensité. L'amplitude de variation du pG1 tombe à 15-20 points au cours des deux premiers jours de limitation (Figure 60). **La population est donc fortement désynchronisée par l'instauration de la limitation en azote.**

La désynchronisation d'une population quand les conditions deviennent défavorables peut s'expliquer à travers l'hypothèse de la **variabilité inter-individuelle**. En fonction de leurs caractéristiques propres, les cellules arrivent plus ou moins à s'acclimater aux conditions défavorables et *in fine* à compléter ou non un cycle au cours d'une période circadienne.

1.1.2. Effet à moyen terme

Le signal de dénombrement cellulaire devient moins bruité après 6 jours en conditions limitantes (Figure 57). Au-delà, un pic du taux de division est à nouveau visible chaque jour mais la phase est décalée par rapport aux conditions *témoin*. Le maximum est localisé en deuxième partie de nuit, entre 00h et l'aube. Ces résultats mettent en évidence la possible **resynchronisation**, au moins partielle, d'une population en conditions défavorables à la croissance. Le suivi du cycle cellulaire au jour 10 confirme la partielle resynchronisation puisque l'amplitude de variation du pG1 sur 24h remonte à 25-30 points (Figure 60).

Ce résultat peut être analysé à la lumière des hypothèses formulées dans le chapitre précédent, à savoir que l'avancement du cycle cellulaire est contrôlé à la fois par les conditions de croissance et par une horloge interne. Nous avons identifié que ce rythme circadien limitait la division au sein de deux fenêtres temporelles (des « portes ») en fin de journée et fin de nuit. Ici, les conditions de croissance défavorables retardent l'avancement du cycle cellulaire de chaque individu. Au niveau macroscopique, le statut nutritionnel de la majorité des cellules ne permet pas d'entrer en mitose lors de la première « ouverture de porte » (en fin de journée), celles-ci doivent attendre la seconde pour se diviser (en fin de nuit).

1.1.3. Comportement après la levée de la limitation

Nous avons également suivi le comportement du taux de division au cours de la levée de la limitation, déclenchée par l'ajout de nitrates dans la culture puis le retour aux conditions *témoin*. La Figure 58 met en évidence une resynchronisation immédiate de la population dès le retour en conditions favorables (jour 2). Le taux de division reprend sa phase originelle dès le premier jour du retour en condition *témoin* : le maximum du pic majeur se replace en fin de journée. Un deuxième pic localisé en fin de nuit réapparaît au 3^e jour des conditions *témoin* (jour 5). Ces résultats montrent que **la resynchronisation de la population sur un changement favorable est immédiate**.

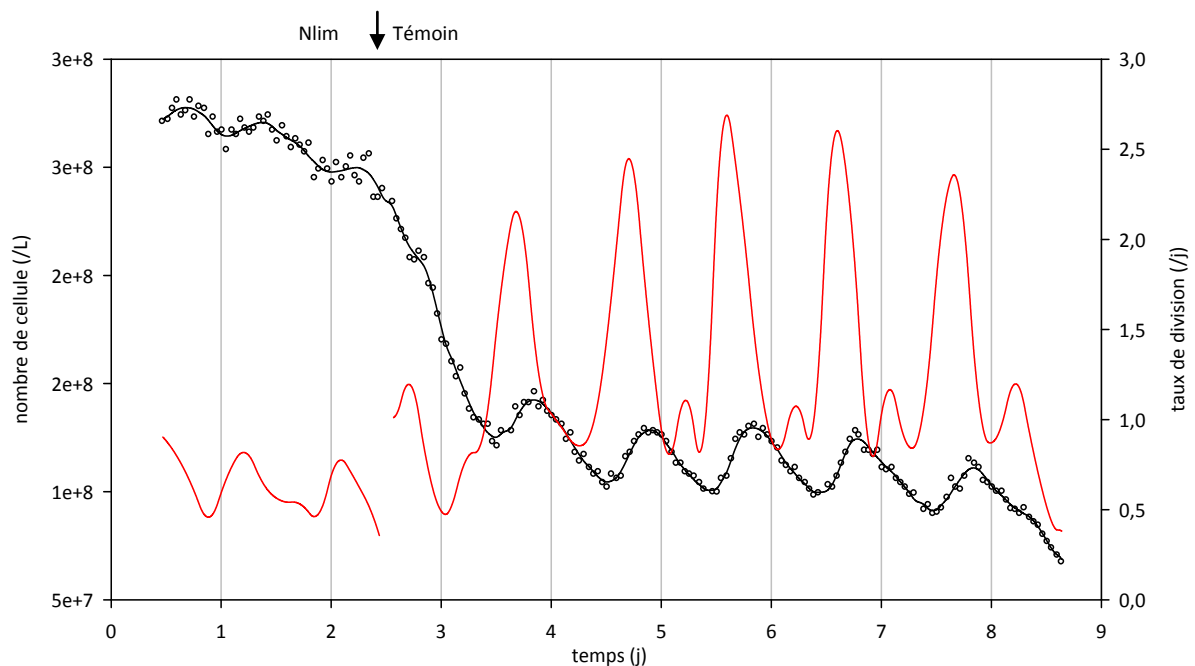


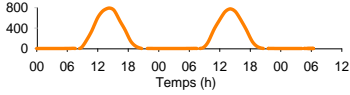
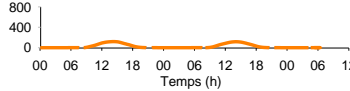
Figure 58. Nombre de cellules (en noir, points = mesures, courbe = lissage) **et taux de division** (en rouge) **lors du retour aux conditions *témoin* en fin d'expérience *Nlim1***. La flèche symbolise la réaugmentation du taux de dilution de $0,69.j^{-1}$ à $1,4.j^{-1}$ à $2,5.j^{-1}$. Chaque trait vertical symbolise minuit.

1.2. Effet d'une limitation de la croissance par la lumière

Les conditions de l'expérience *Llim1* (Tableau 12) sont particulièrement intéressantes pour suivre l'effet d'une limitation par la lumière sur la synchronisation, car la diminution du flux de photons engendre une modification de la dynamique de division tout en permettant la poursuite de la croissance (Figure 59).

Dans la phase d'acclimatation en conditions *témoin* (jusqu'au jour 0), le taux de division présente un pic mineur en fin de nuit et un pic majeur en fin de journée (Figure 59). Au premier jour des nouvelles conditions de lumière (jour 0), le pic de fin de journée est fortement diminué. Par la suite, la phase du signal n'est pas modifiée mais les deux pics journaliers sont d'intensités comparables.

Tableau 12. Rappel des conditions des expériences "témoin" et "Llim1"

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
Témoin	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
Llim1	Max = 120 Dose = 4,2 	D = 0,5/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

La diminution de la dose de lumière modifie donc l'équilibre des proportions de la population se divisant lors des deux « ouvertures de portes ». En conditions *témoin*, la majorité de la population procède en mitose lors de l'évènement de fin de journée (Cf. p78) alors que dans ces conditions de plus faible dose de lumière, la part des cellules se divisant au cours des deux évènements est comparable (Figure 59).

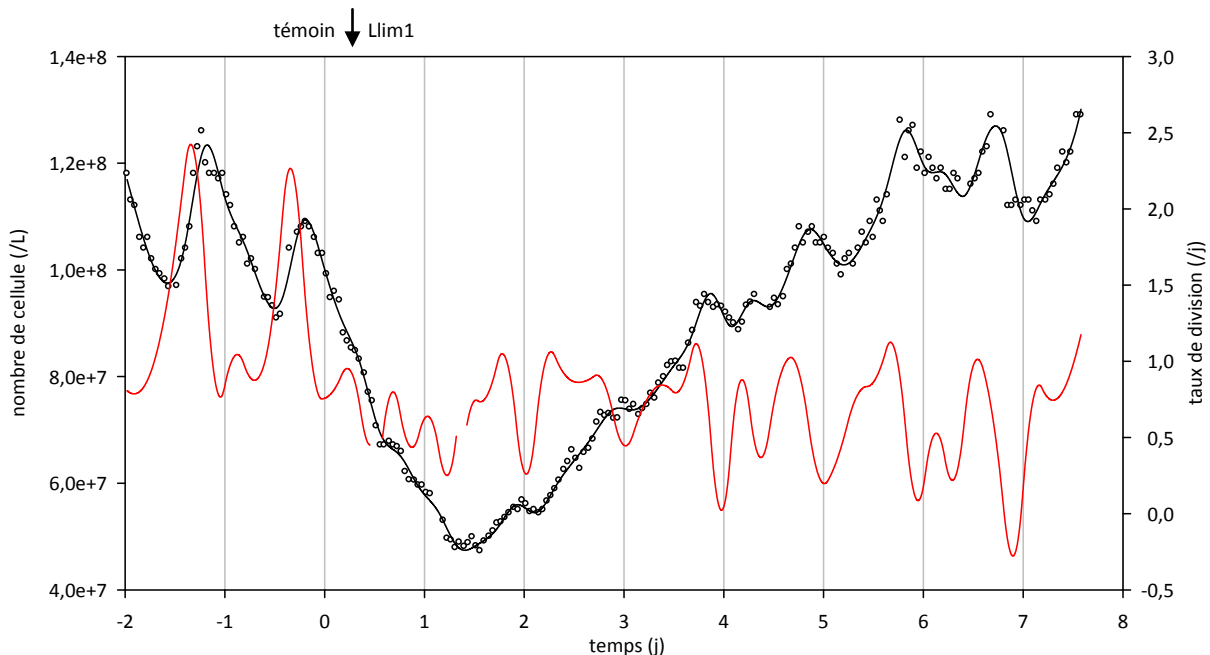


Figure 59. Nombre de cellules (en noir, points = mesures, courbe = lissage) **et taux de division** (en rouge) **lors de l'expérience Llim1**. La flèche symbolise la diminution du flux de photons (jour 0). Une diminution du taux de dilution de $1,4 \cdot \text{j}^{-1}$ à $1,0 \cdot \text{j}^{-1}$ a lieu à $\text{j}0,7$ et une seconde à $0,5 \cdot \text{j}^{-1}$ a lieu à $\text{j}1,4$. Chaque trait vertical symbolise minuit.

Le suivi du cycle cellulaire confirme la diminution du degré de synchronisation de la population (Figure 60). Mais contrairement aux observations faites à partir du taux de division, il ne

met pas en évidence de changement dans la phase du signal entre les jours 0 et 2 (Figure 59). La divergence observée entre les deux approches peut provenir du fait qu'elles sont obtenues à partir de mesures de types très différents. Momentanément, les changements de structure au sein de la population ne doivent pas être perceptibles de la même façon par ces deux techniques.

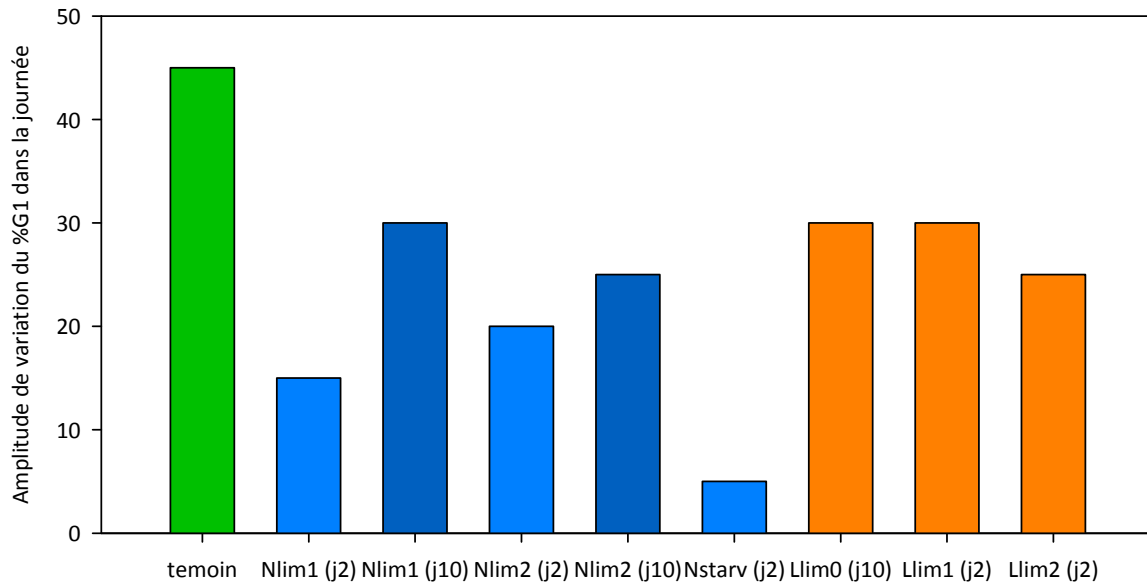


Figure 60. Amplitude diurne de la variation du pourcentage de cellules en phase G1 dans les différentes expériences. *Témoin* : conditions non limitante ; *Nlim1* et 2 : limitation par l'azote ; *Nstarv* : carence en azote ; *Llim1* et 2 : limitation par la lumière ; j2, j10 : au 2^e, 10^e jour des conditions limitantes.

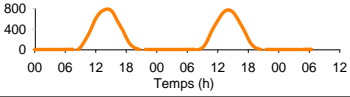
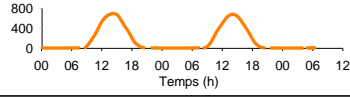
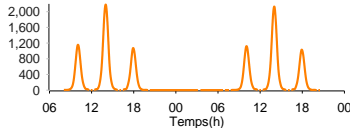
→ Ainsi, une modification de la disponibilité en azote ou en lumière entraîne une double modification de la synchronisation de la population. D'une part, le degré de synchronisation est affecté. Cet effet peut n'être que temporaire puisqu'une resynchronisation est perceptible après 10 jours de limitation par l'azote (Figure ci-dessus). D'autre part, ces limitations modifient le timing de la division au sein de la population synchronisée. Les deux fenêtres temporelles localisées dans le chapitre précédent (fin de nuit et fin de journée) sont conservées mais le rapport de cellules procédant en mitose dans chaque intervalle change en fonction des conditions. Une limitation de la croissance par l'azote dans l'expérience *Nlim1* cause un basculement général vers la fenêtre de la fin de nuit (Figure 57) alors qu'une limitation par la lumière dans l'expérience *Llim1* provoque une répartition homogène de la division au sein de ces deux intervalles (Figure 59).

2. Effet d'une modification du signal lumineux sur la synchronisation

Dans l'océan, les conditions ressenties par une microalgue sont fortement variables car elles dépendent à la fois de la variation des ressources dans le temps et l'espace et de la trajectoire de la cellule dans cet espace au cours du temps. Dans une couche de mélange, il faut ainsi prendre en compte le déplacement des microalgues dans la colonne d'eau. La couche de mélange (Mixed layer) est la partie supérieure de la colonne d'eau, homogénéisée par d'actives turbulences produites par le vent ou la convection océanique (Mupparapu & Brown 2002). La matière dissoute et les petites particules telles que les microalgues sont entraînées par ces turbulences à travers toute la profondeur de la couche de mélange. Plus elle sera profonde et plus les cellules phytoplanctoniques seront soumises à des périodes de faible éclaircissement.

Une façon simplifiée de représenter ces conditions est d'ajouter, au cycle lumineux diurne de surface, une fréquence propre à la couche de mélange. Celle-ci dépend de sa profondeur et de la vitesse moyenne des particules à l'intérieur, et ces paramètres dépendent eux même des conditions environnementales (p. ex. la vitesse du vent). Nous avons choisi de représenter de façon lagrangienne les conditions de croissance s'appliquant à une cellule type au sein d'une couche de mélange. En d'autre terme, nous avons reconstitué au laboratoire le signal lumineux auquel cette cellule type a pu être exposée au cours de son trajet dans la colonne d'eau. Nous avons choisi arbitrairement de représenter les conditions qui s'appliqueraient à une cellule faisant 6 fois par jour le trajet entre la surface et le fond d'une couche de mélange plus profonde que la couche euphotique. En conséquence, le signal choisi expose la population à de fortes variations d'intensité lumineuse diurnes (Tableau 13 page suivante). Nous avons testé l'effet de ce signal sur une population acclimatée à un cycle lumineux diurne classique (12:12) en conservant la même dose de lumière dans les deux conditions. La phase de simulation des conditions de couche de mélange est appelée « *ML* » (pour « Mixed-layer ») et la phase d'acclimatation est appelée « *pré-ML* ».

Tableau 13. Rappel des conditions des expériences "Témoin", "pré-ML" et "ML"

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
Témoin	Max = 800 Dose = 17 	D = 1,4/j D est ajusté sur $\mu = \mu_{\text{max}}$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
Pré-ML	Max = 700 Dose = 15 	D = 1,4/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
ML	Max = 2200 Dose = 15 	D = 0,9/j $D \geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$

2.1. Impact sur la croissance au niveau individuel

A dose constante, le changement du signal de lumière provoque une diminution du taux de division moyenné sur 24h de $1,40.\text{j}^{-1}$ en situation *pré-ML* à 1,05 en condition *ML* (Figure 61). Cette diminution d'environ un tiers est à relier au morcellement et à la réduction de la période éclairée. De plus, les microalgues sont acclimatées à un flux maximum de photons de $700\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en condition *pré-ML*, or cette intensité triple au midi solaire en condition *ML*. L'appareil photosynthétique des cellules n'est pas préparé à recevoir et utiliser ces intensités, ce qui diminue le rendement énergétique (Long *et al.* 1994).

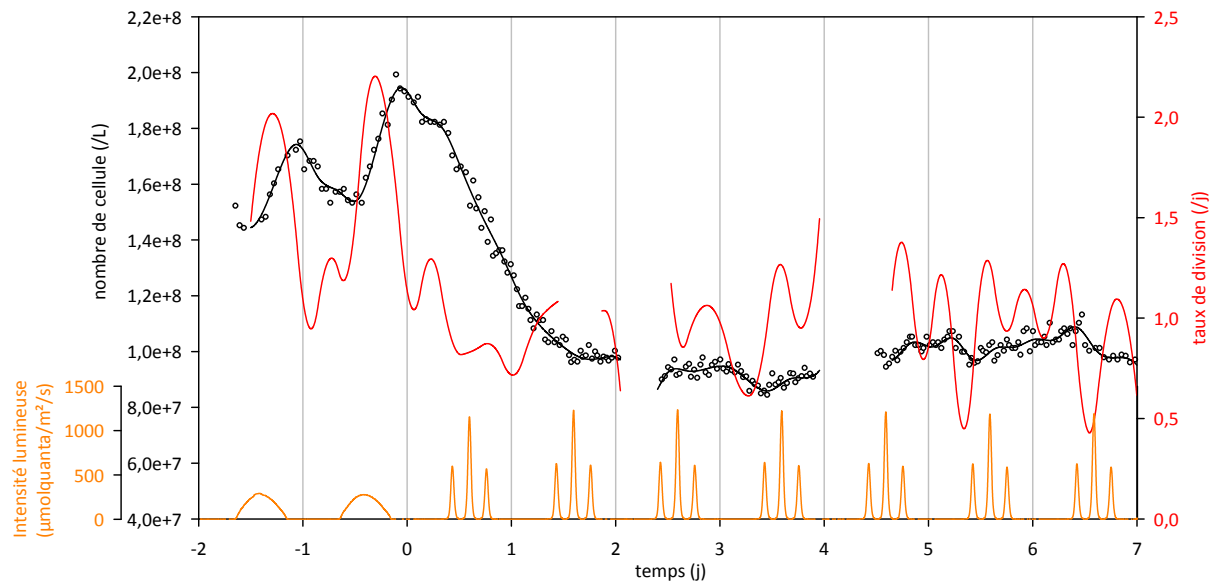


Figure 61. Nombre de cellules (en noir, points = mesures, courbe = lissage), **taux de division** (en rouge) et **éclairage** (en orange) en conditions *pré-ML* et *ML*. Le taux de dilution est abaissé de $1,4.j^{-1}$ à $0,96.j^{-1}$ à $j1,6$.

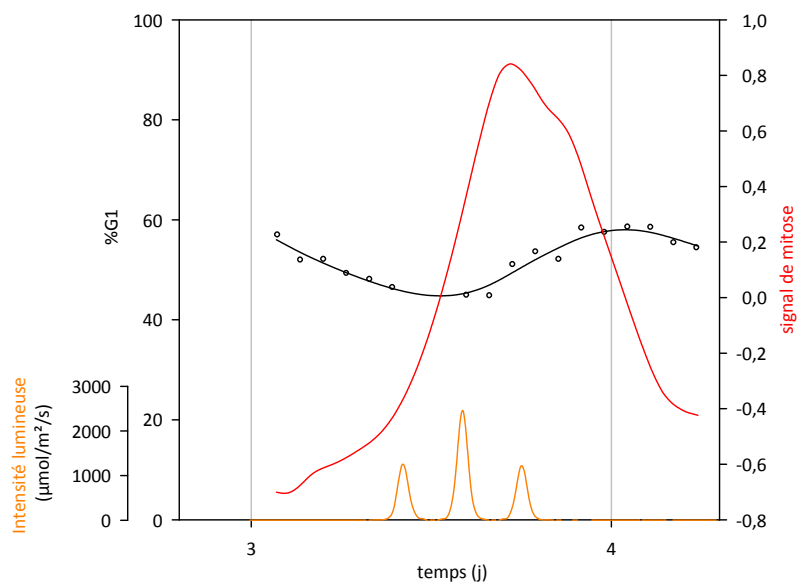


Figure 62. Pourcentage de cellules en phase G1 (en noir, points = mesures, courbe = lissage), **signal de mitose** (en rouge) et **éclairage** (en orange) au 3^e jour en conditions *ML*.

2.2. Impact sur la synchronisation

La modification du signal de lumière étant défavorable à la croissance des microalgues, elle fait apparaître des différences interindividuelles masquées en conditions *pré-ML*. En effet, comme dans le cas d'une diminution de la dose de lumière ou de l'apport d'azote, le temps nécessaire pour boucler un cycle dépend des caractéristiques métaboliques individuelles, rendant chaque cellule plus ou moins compétitive par rapport aux autres. En conséquence, **la population est fortement désynchronisée**, comme en atteste le signal bruité du taux de division (Figure 61) et les faibles variations du pG1. Elles sont de 45 points dans les conditions de l'expérience *témoin*, de 15pts au 3^e jour de l'expérience *ML* puis ne sont plus perceptibles au delà (Figure 62).

2.3. Impact sur les flux de matière à l'échelle de la population

En conditions *pré-ML* au jour -1, le taux d'acquisition d'azote est fortement asymétrique par rapport au signal de lumière (Figure 64). Au contraire, la cinétique de fixation de carbone est identique à celle du flux de photons (Figure 63). L'évènement majeur de mitose ayant lieu en fin d'après midi au niveau de la population (Figure 62), et notre hypothèse selon laquelle une cellule n'acquiert pas d'azote au cours de cette phase, expliquent la diminution anticipée du flux d'azote observée au niveau de la population (Figure 64).

En conditions *ML* entre les jours 5 et 6, les taux d'acquisition d'azote et de fixation de carbone sont fortement corrélés entre eux et au flux de photons (Figure 64). La population étant asynchrone, il n'y a plus d'évènement synchrone de mitose. **Cela ne remet pas en cause l'hypothèse opposant mitose et acquisition d'azote, mais signifie que cette opposition s'applique individuellement à chaque cellule, et qu'elle n'a plus d'effet macroscopique lorsque la population est asynchrone.** En conséquence, les contenus en composés dérivés du carbone et de l'azote, tels que la Chla, les protéines et les glucides, fluctuent eux aussi en phase avec le flux de photons (Figure 65).

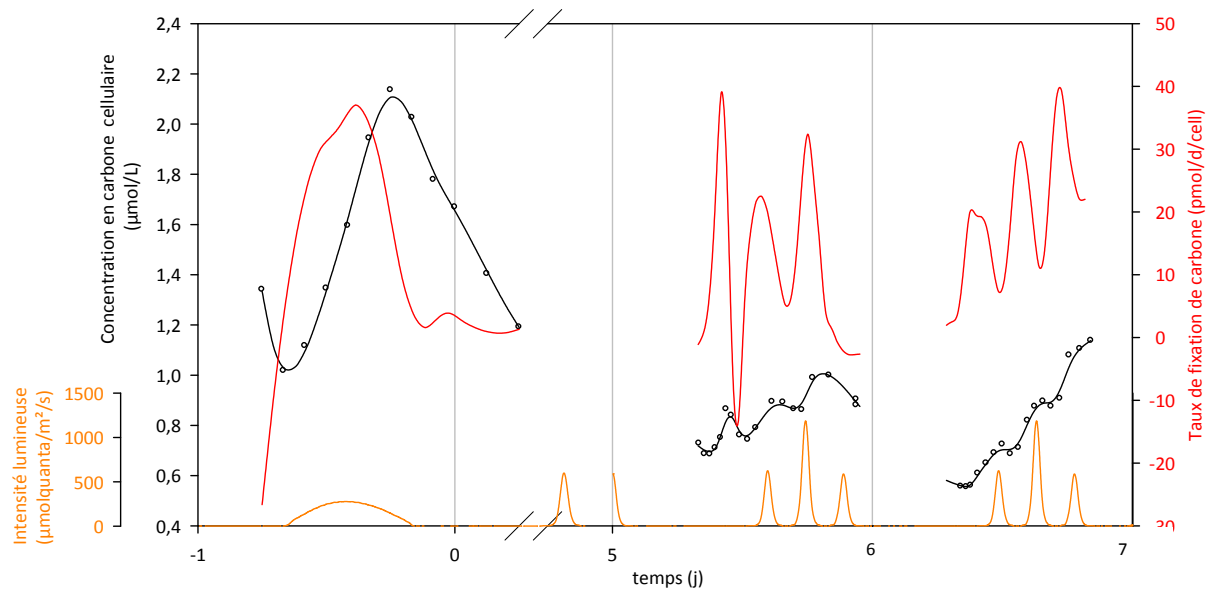


Figure 63. Concentration en carbone cellulaire (en noir, points = mesures, courbe = lissage), **taux de fixation de carbone** (en rouge) et **éclairage** (en orange) en conditions *pré-ML* et *ML*. Noter le saut temporel entre les jours 0 et 5.

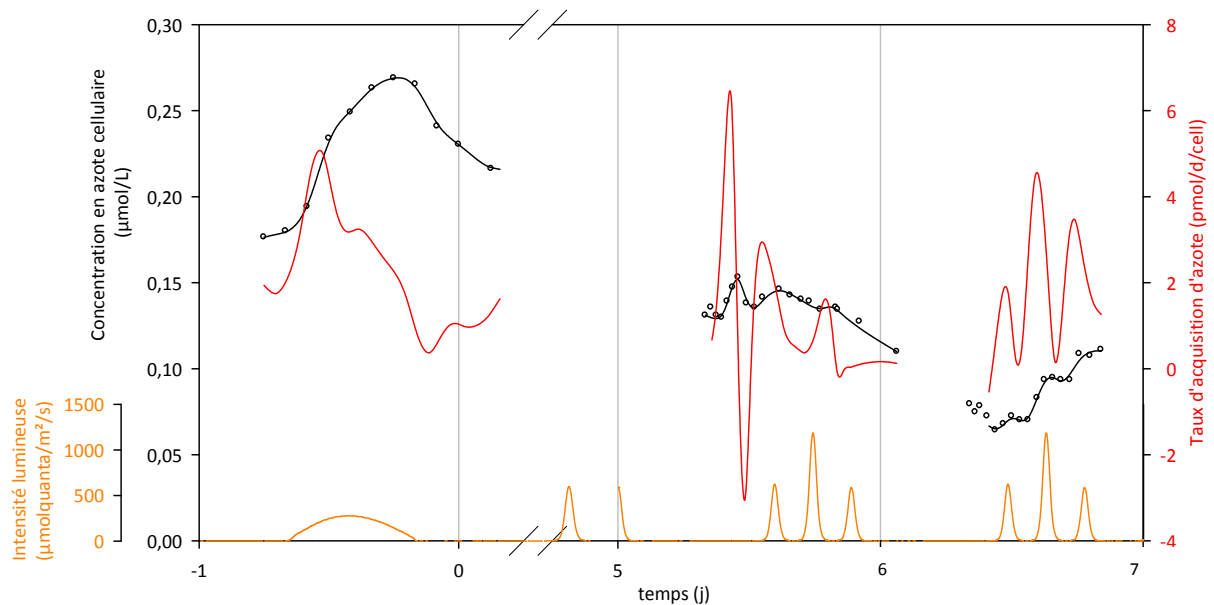


Figure 64. Concentration en azote cellulaire (en noir, points = mesures, courbe = lissage), **taux d'acquisition d'azote** (en rouge) et **éclairage** (en orange) en conditions *pré-ML* et *ML*. Noter le saut temporel entre les jours 0 et 5.

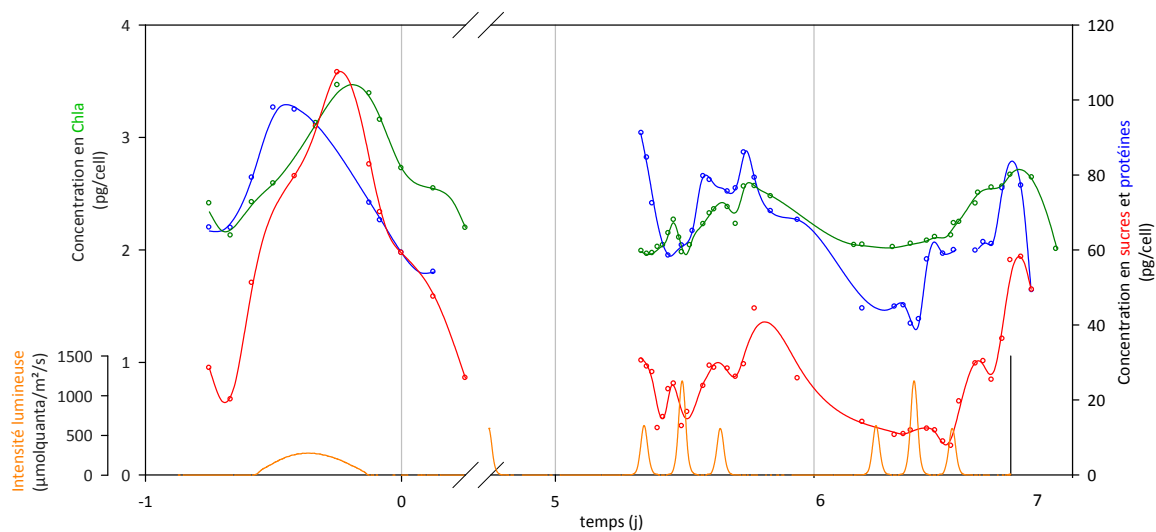


Figure 65. Quotas cellulaires en chlorophylle a (en vert), protéines (en bleu) et glucides (en rouge) et éclairement (en orange) en conditions pré-ML et ML. Noter le saut temporel entre les jours 0 et 5.

3. Quelles sont les conséquences macroscopiques de la synchronisation ?

L'effet individuel du passage en mitose sur l'acquisition d'azote est donc plus ou moins ressenti au niveau de la population en fonction de la proportion de la population qui procède ensemble dans cette phase.

Dans ce contexte, une limitation en azote affecte négativement le degré de synchronisation de la population. Les événements de division sont répartis sur plusieurs intervalles quotidiens, ce qui modère leur effet sur la population.

Un changement du signal synchronisateur, ici la lumière, peut être à l'origine d'une complète désynchronisation. Dans notre expérience ML, les oscillations à hautes fréquences de l'intensité lumineuse neutralisent l'effet du cycle cellulaire sur les flux d'azote de la population, puisque chaque cellule avance dans son cycle de façon asynchrone. Les flux globaux sont donc uniquement liés à court et moyen termes aux conditions énergétiques et nutritionnelles (Figure 63 à Figure 65, Cf. chapitre suivant). Cette globale désynchronisation est contradictoire avec l'hypothèse du *gating* (Cf. chapitre précédent). **L'oscillateur interne responsable de la restriction temporelle de la division semble neutralisé par un signal lumineux variable à haute fréquence.**

Les résultats de l'expérience ML remettent donc en question la validité dans le milieu marin des hypothèses issues d'expériences réalisées sous cycle lumineux diurne. Pourtant, d'autres expériences simulant des conditions variables de lumières ont montré la persistance d'une synchronisation (Edmunds & Funch 1969). Pour expliquer ces différences, la fréquence du signal

lumineux semble être particulièrement importante (Kroon *et al.* 1992). Reprenons l'expérience similaire de Pawlowski (Cf. p38) conduite sur la même souche que celle utilisée dans nos travaux mais avec une fréquence des oscillations lumineuses nettement inférieure ($0,3.j^{-1}$) à la notre ($6.j^{-1}$). Dans ces conditions où l'éclairement est dispensé pendant environ une journée tous les trois jours, les divisions se font de manière synchrones après une dizaine d'heures d'éclairement, et le lendemain en fin de journée subjective. Notre hypothèse est que lorsque de longues périodes d'obscurités encadrent des périodes de jour, tous les cycles se bloquent au niveau du point de blocage sur la lumière. Le corollaire est que l'effet de la variabilité interindividuelle apparaît quand la fréquence des oscillations augmente. Notons que la fréquence utilisée dans notre expérience correspond à un ordre de grandeur de $1cm.s^{-1}$ en vitesse verticale. Cette valeur est cohérente en milieu naturel (Louis Prieur, comm. pers. 2009), et dix fois supérieure à celle des conditions de Pawlowski.

→ Ainsi, une diminution de la disponibilité en lumière et nutriment ou une dégradation du signal lumineux diurne sont autant de conditions défavorables à la croissance qui mettent à jour des différences individuelles en induisant une désynchronisation de la population. Dans la majorité des cas testés, une partie variable des cellules continue toutefois de croître selon un rythme synchrone, prêtant ainsi à l'effet individuel du passage en mitose des conséquences macroscopiques plus ou moins marquées.

Chapitre VI

Comment s'intègrent les effets du cycle cellulaire et du statut physiologique sur la prise d'azote



VI. Intégration des effets du cycle cellulaire et du statut physiologique

Dans la littérature, la variation diurne de la prise d'azote est généralement expliquée par des considérations d'ordres nutritionnel et énergétique (détails p34). Mais, selon l'hypothèse formulée dans le chapitre III, la mitose interrompt la prise d'azote au niveau cellulaire, et selon celle du chapitre V, cette interruption est relayée au niveau de la population en fonction de son degré de synchronisation. Ce chapitre a maintenant pour but de comprendre comment les propriétés induites par l'existence d'un cycle cellulaire et celles inhérentes au statut physiologique se conjuguent pour moduler la prise d'azote macroscopique. Nous allons détailler les effets à court et moyen termes du statut physiologique et identifier de possibles anomalies dues à l'impact de la mitose. Les conditions des différentes expériences discutées dans ce chapitre sont détaillées p72.

1. Effet de l'état énergétique

1.1. Echelle horaire

Dans nos expériences, la fixation de carbone est une fonction linéaire de l'intensité lumineuse instantanée (Figure 66 page suivante), sauf sous faible éclairément (expériences *Llim*) où la relation n'est pas significative ($p\text{value} > 0,05$). En conditions non limitantes d'azote, chaque cellule fixe à chaque seconde environ 0,58fmolC par μmole de photons reçue sur 1m^2 . Quand la croissance est limitée par l'azote, ce taux tombe à 0,34 (calculé à partir des pentes de la régression). Au-delà de $800\mu\text{molquanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le lien s'inverse avec une pente plus faible.

L'effet direct et immédiat de la lumière sur le métabolisme de l'azote se manifeste clairement dans l'expérience *ML*, qui simulent de façon lagrangienne les conditions lumineuses ressenties par une cellule type dans une couche de mélange. L'acquisition d'azote, tout comme la fixation de carbone, suit les variations temporelles du flux de photons (Figure 63 et Figure 64 p129). Une analyse de cross-corrélation entre ces différents signaux confirme l'évolution parallèle. Pourtant, le lien linéaire entre le flux de photons et l'acquisition d'azote n'est significatif que dans les expériences *témoin* et *ML* (Figure 67). La pente de cette relation est positive jusqu'à environ $800\mu\text{molquanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, puis devient nulle ou négative au-delà. La relation peut être représentée aussi bien par deux segments linéaires que par une fonction de Michaelis-Menten. Cependant, les coefficients de détermination (r^2) sont inférieurs à ceux calculés pour la fixation de carbone. En

détaillant les résultats de l'expérience *témoin*, une hystérésis diurne est visible dans le mode d'acquisition de l'azote (Figure 69). Ce phénomène est le signe qu'un facteur différent de l'intensité lumineuse peut affecter la prise d'azote, notamment dans la deuxième partie de la journée. Le fait que les points se trouvant sous la droite de corrélation correspondent à des mesures réalisées lors du passage massif de la population en M corrobore notre hypothèse que mitose et prise d'azote sont mutuellement exclusives. Nous noterons que ce phénomène n'est pas visible sur la fixation de carbone (Figure 68).

De nuit, l'acquisition d'azote peut être reliée au contenu en sucres par cellules mais le coefficient de détermination obtenu est encore plus faible que précédemment. Une nouvelle fois, les points les plus bas correspondent à des mesures effectuées alors que le signal de mitose est positif (Figure 70).

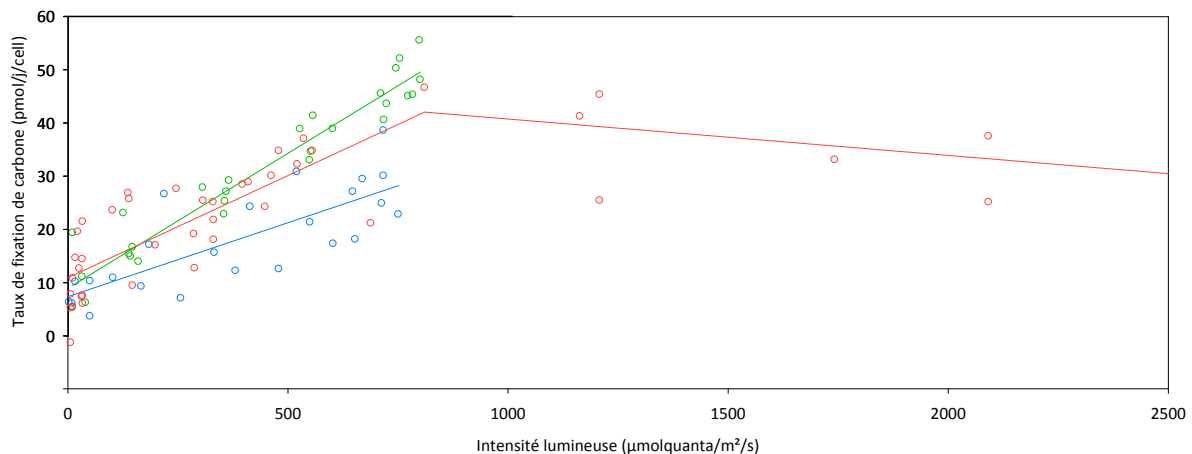


Figure 66. Relations linéaires entre le taux de fixation de carbone et l'intensité lumineuse instantanée dans les expériences *témoin* (vert, linéaire $r^2=0,93$), *Nlim1* (bleu, linéaire $r^2=0,62$) et ML (rouge, linéaire 2 segments $r^2=0,69$).

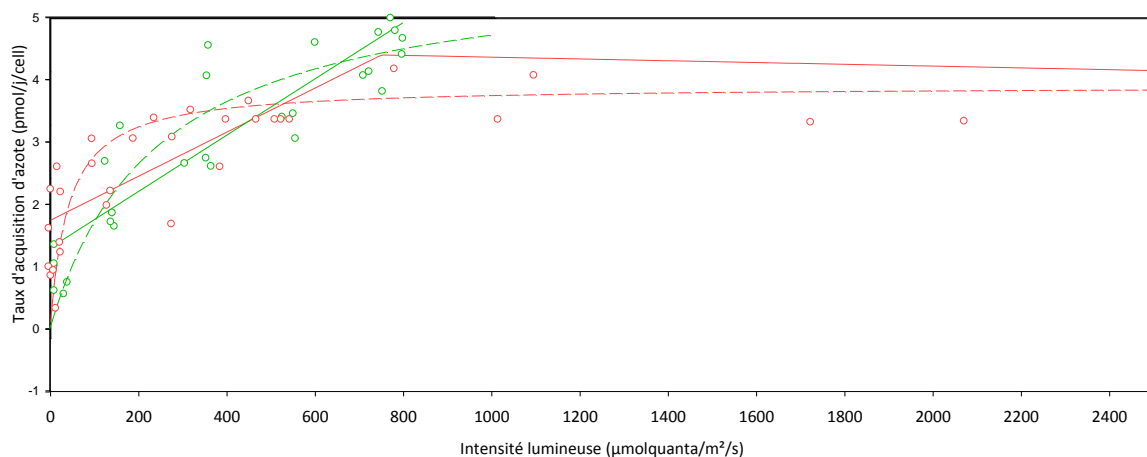


Figure 67. Relations linéaires et de Michaelis-Menten (MM) entre le taux d'acquisition d'azote et l'intensité lumineuse instantanée dans les expériences *témoin* (bleu, linéaire $r^2=0,78$, MM $r^2=0,80$) et ML (vert, linéaire 2 segments $r^2=0,59$, MM $r^2=0,56$).

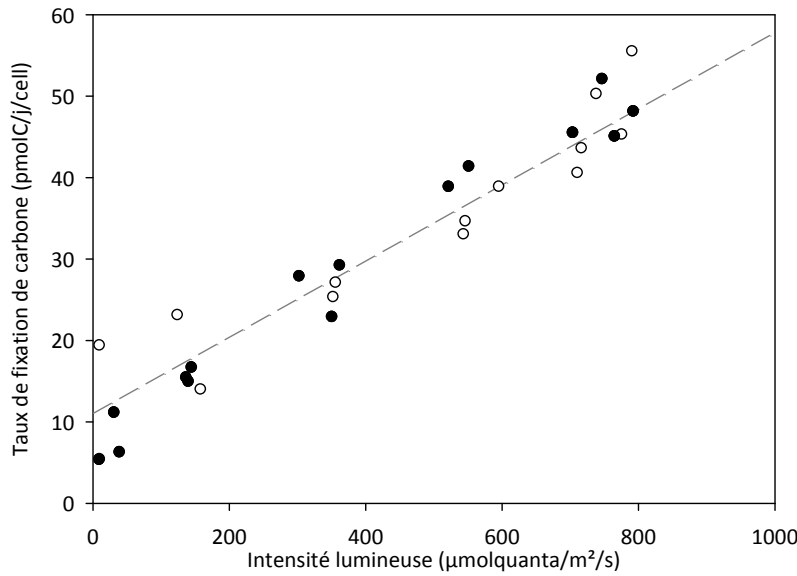


Figure 68. Corrélation entre le taux de fixation de carbone et l'intensité lumineuse sur 2,5 cycles lumineux diurnes en conditions *témoin*.
 $r^2=0,93$, $p\text{value} < 0,05$
 Les points marqués correspondent à un signal de mitose positif

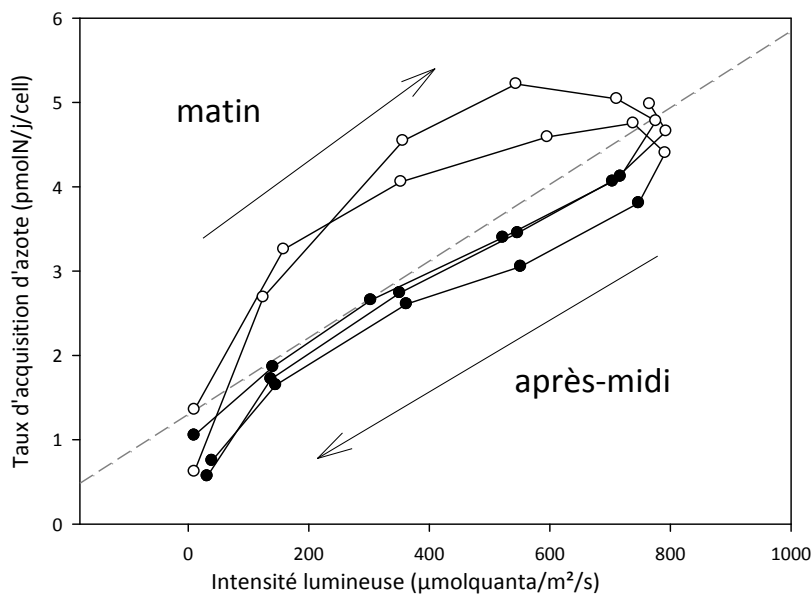


Figure 69. Corrélation entre le taux d'acquisition d'azote et l'intensité lumineuse sur 2,5 cycles lumineux diurnes en conditions *témoin*.
 $r^2=0,78$, $p\text{value} < 0,05$
 Les points marqués correspondent à un signal de mitose positif

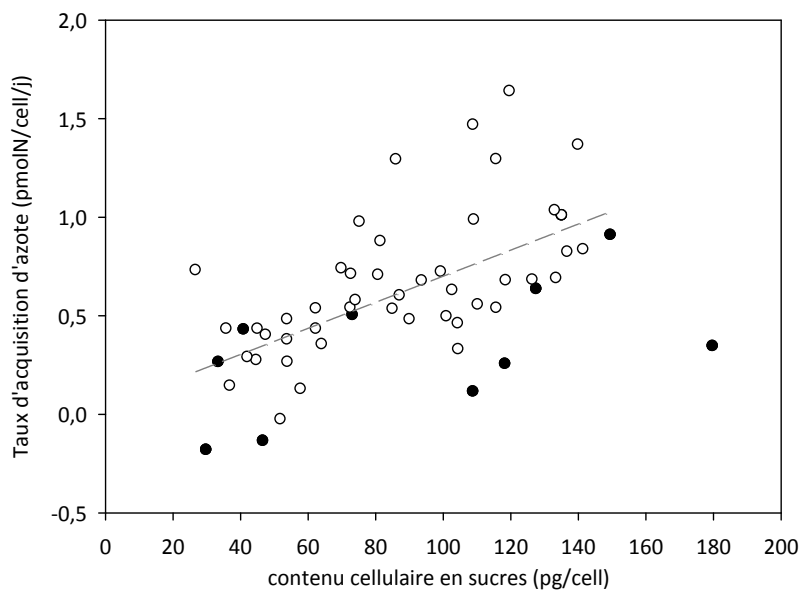
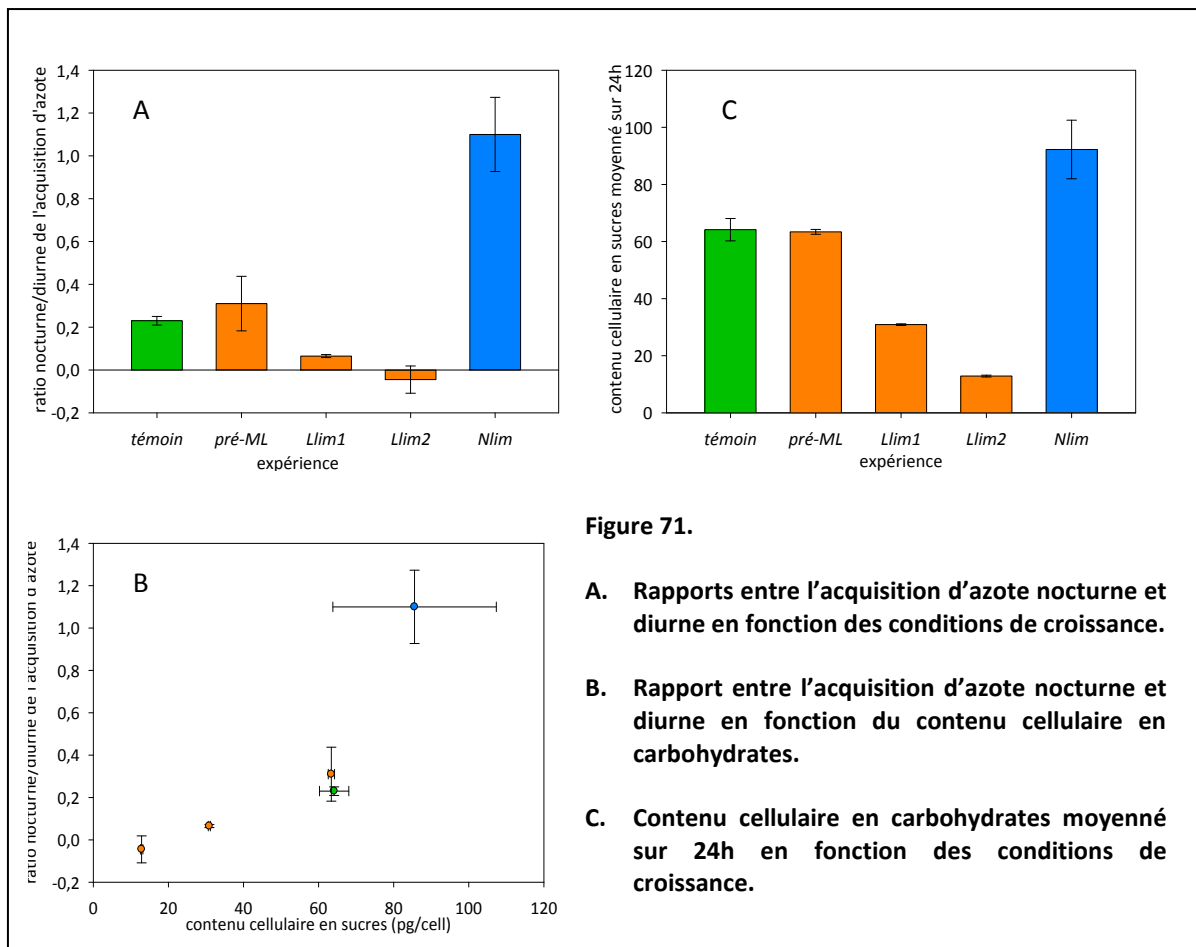


Figure 70. Corrélation entre le taux d'acquisition d'azote et le contenu cellulaire en sucres de nuit dans les expériences *témoin* et *Nlim*.
 $r^2=0,37$, $p\text{value} < 0,05$.
 Les points marqués correspondent à un signal de mitose positif

1.2. Echelle diurne

Quand la croissance n'est pas limitée par l'azote, son acquisition a lieu essentiellement le jour. Cependant, le rapport entre les taux d'acquisition diurne et nocturne varie en fonction de la dose de lumière reçue : la part nocturne est plus élevée dans les expériences *témoin* et *pré-ML* (Figure 71A), alors que la dose de lumière limitée des expériences *Llim* a conduit à réduire la proportion nocturne. Ces observations traduisent le fait que la part nocturne de l'acquisition d'azote requiert de l'énergie. Celle-ci peut provenir du catabolisme des glucides (Figure 71B), dont la teneur intracellulaire en fin de journée dépend elle-même de la dose de lumière (Figure 71C, Vanlerberghe et al. 1992, Cf. détails p29).



1.3. Moyen terme

A une échelle de temps supérieure à un jour, les taux d'acquisition d'azote et de carbone sont déterminés par la dose de lumière reçue par les cellules, comme le montre la Figure 72. Le taux de division suit la même évolution, permettant une conservation relative des contenus en carbone et azote (Figure 72, courbe noire).

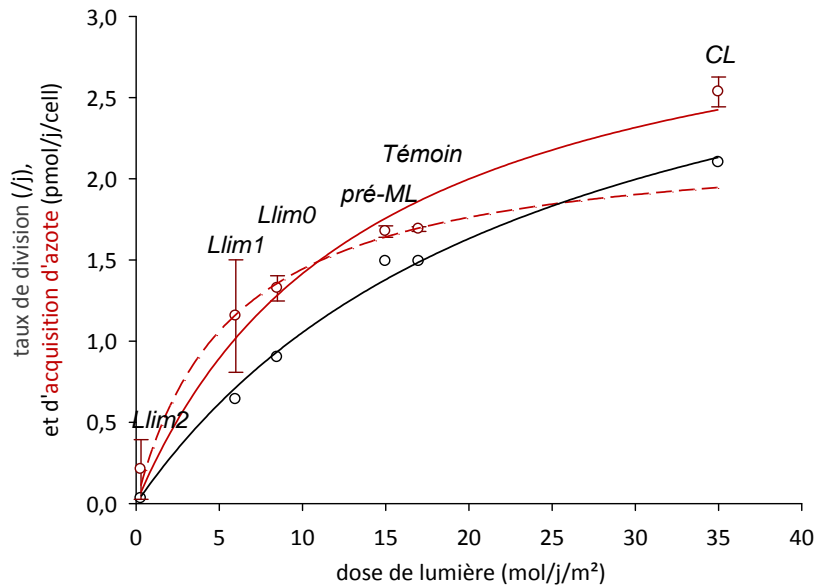


Figure 72. Taux de division et d'acquisition d'azote dans les différentes expériences conduites sans limitation en azote. Données moyennées sur 24h. Les doses inférieures à $20 \text{ mol.j}^{-1}.\text{m}^{-2}$ sont réparties en cycles lumineux diurnes, la dose maximale correspond à un éclaircissement continu. Les courbes représentent des fonctions de Michaelis-Menten. La courbe tiretée ne prend pas en compte le point mesuré en lumière continue.

2. Effet de l'état nutritionnel

2.1. Echelle horaire

A cause de cinétiques d'acquisition différentes entre le carbone et l'azote, le rapport N/C varie au cours d'un jour. Il diminue le jour puisque le carbone est acquis plus rapidement que l'azote, et augmente la nuit puisque seul l'azote est acquis (Figure 73). Nous noterons que la valeur moyenne observée (0,145) est proche du rapport de Redfield (0,15).

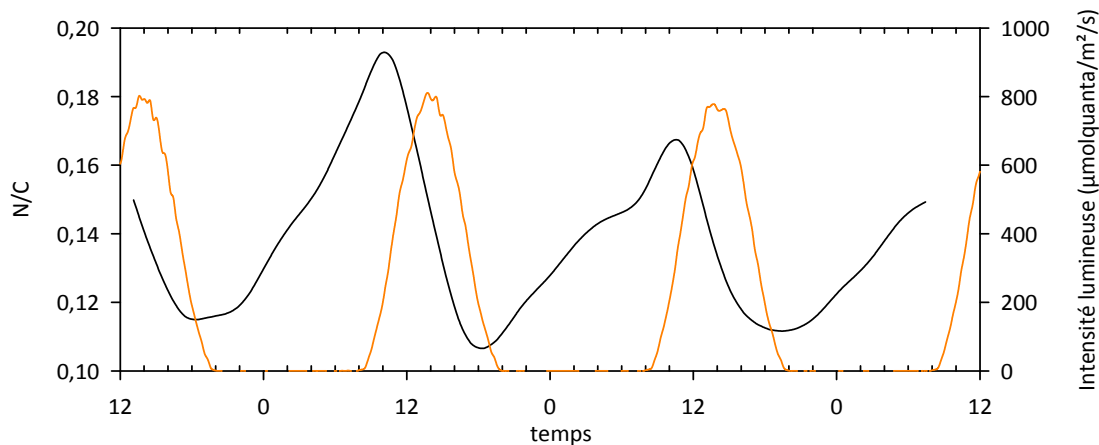


Figure 73. Evolution du ratio N/C (mol/mol) au cours de l'expérience *témoin*.

La question est de savoir si l'évolution du rapport N/C a un impact sur l'acquisition d'azote. Quand l'azote est en excès, le rapport N/C semble avoir un impact différent entre le jour et la nuit (Figure 74). Le jour, l'acquisition d'azote est positivement corrélée au quota en azote jusqu'à une valeur du rapport N/C d'environ 0,14. Au-delà, la relation s'inverse. La nuit, la relation est négative et suit une exponentielle décroissante. La prise en compte de la dimension temporelle permet de comprendre que ces relations s'inscrivent dans un cycle diurne (Figure 74 et Figure 76). A la fin de la nuit, le quota en azote est maximum. Il commence à décroître dès le début de la phase éclairée puisque la photosynthèse et la fixation de carbone reprennent. Parallèlement, le retour de la lumière stimule l'acquisition d'azote. Dans la seconde partie de la journée, la diminution du flux de photon entraîne une diminution de l'acquisition d'azote (et de carbone), mais le rapport N/C continue de baisser car la cinétique d'acquisition d'azote est toujours plus faible que celle du carbone. Ainsi, le moteur principal de la dynamique d'acquisition d'azote sur 24h semble être, non pas le statut nutritionnel de la cellule, mais le flux de photons (Figure 74 et Figure 76).

En situation de limitation azotée, l'acquisition d'azote est corrélée négativement avec le rapport N/C, de jour comme de nuit (Figure 75). L'influence du cycle lumineux diurne n'apparaît plus dans la relation entre l'acquisition d'azote et le rapport N/C. Dans ce cas, le statut nutritionnel de la cellule est le principal moteur de l'acquisition d'azote, inversement proportionnelle à l'écart séparant le rapport N/C de sa valeur maximum.

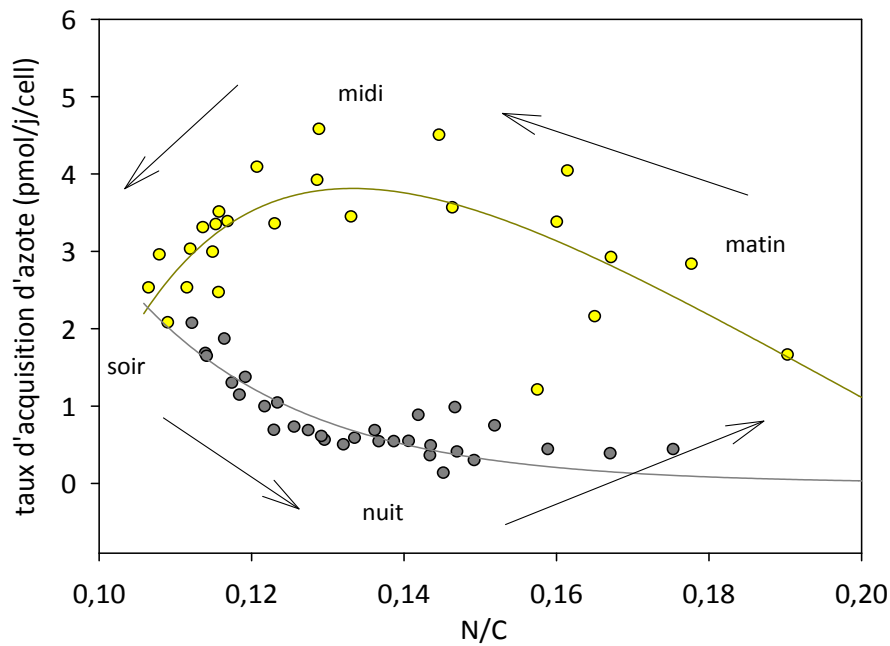


Figure 74. Evolution de l'acquisition d'azote en fonction du quota N/C dans l'expérience *témoin* de jour (jaune, mesures et polynôme cubique) et de nuit (gris, mesures et fonction exponentielle décroissante).

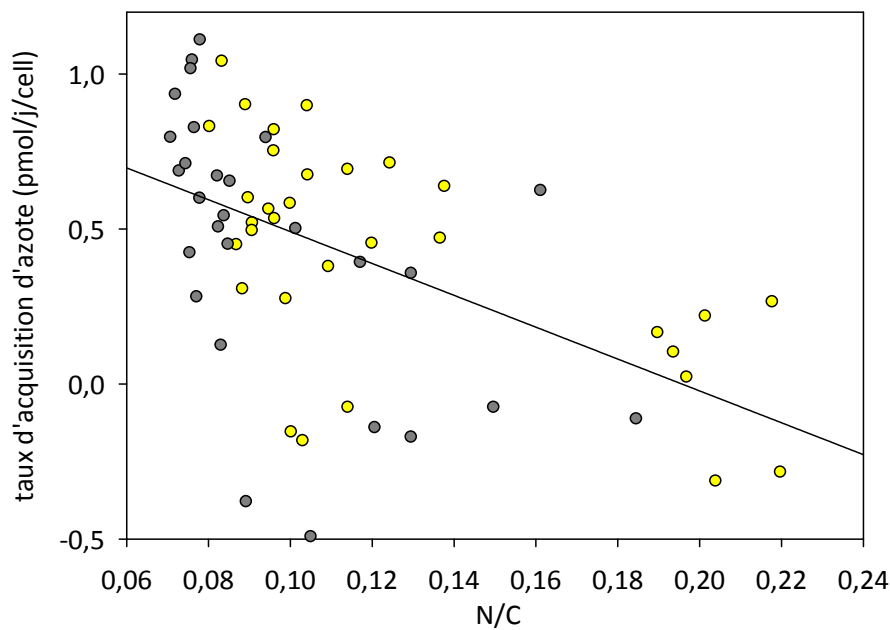


Figure 75. Evolution de l'acquisition d'azote en fonction du quota N/C dans l'expérience *témoin* de jour (jaune) et de nuit (gris). La régression linéaire est calculée sur l'ensemble des mesures ($r^2=0.32$).

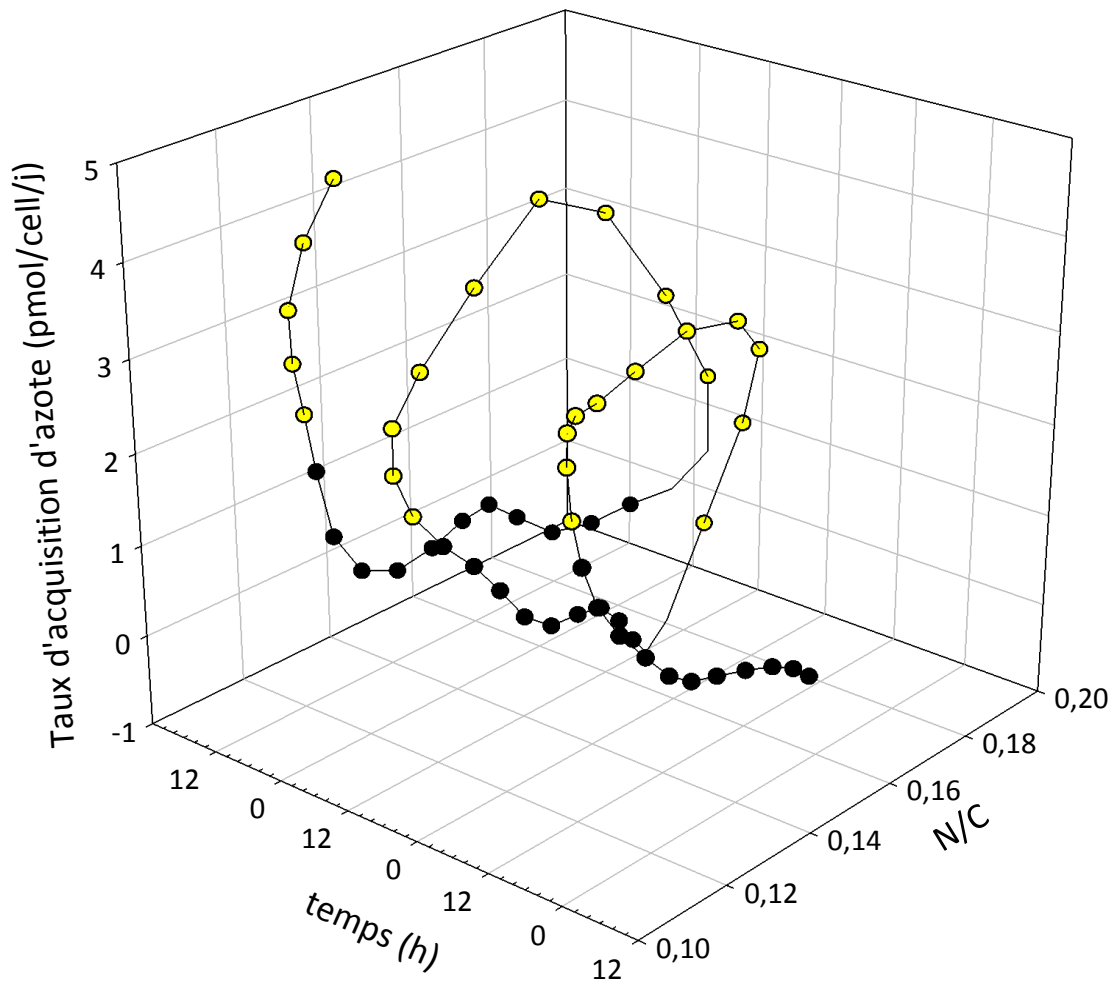


Figure 76. Evolution de l'acquisition d'azote en fonction du temps et du rapport N/C au cours de l'expérience témoin.

2.2. Echelle diurne et moyen terme

La Figure 71A (p138) montre que l'acquisition d'azote est comparable de nuit comme de jour chez des cellules dont la croissance est limitée par l'azote (rapport nuit/jour ≈ 1), alors que la part nocturne est faible, voire marginale dans les autres cas. Ce constat est cohérent avec celui établi par Clark *et al.* (2002a) selon lequel la part nocturne de l'acquisition d'azote n'est significative que dans un environnement limitant en azote. Il est également cohérent avec le fait que le contenu cellulaire en glucides est maximal quand l'azote est limitant (Figure 71C). Notre hypothèse est qu'une limitation en azote, et donc un faible quota N/C à l'échelle diurne, favorise la production de réserves énergétiques qui seront utilisées la nuit afin de poursuivre l'acquisition de nitrates.

A une échelle de temps supérieure à un jour, l'acquisition d'azote par cellule est proportionnelle à la quantité d'azote apportée dans le milieu (Figure 77). Les taux de fixation de carbone et de division suivent globalement la même tendance, permettant de maintenir approximativement les contenus cellulaires en carbone et azote.

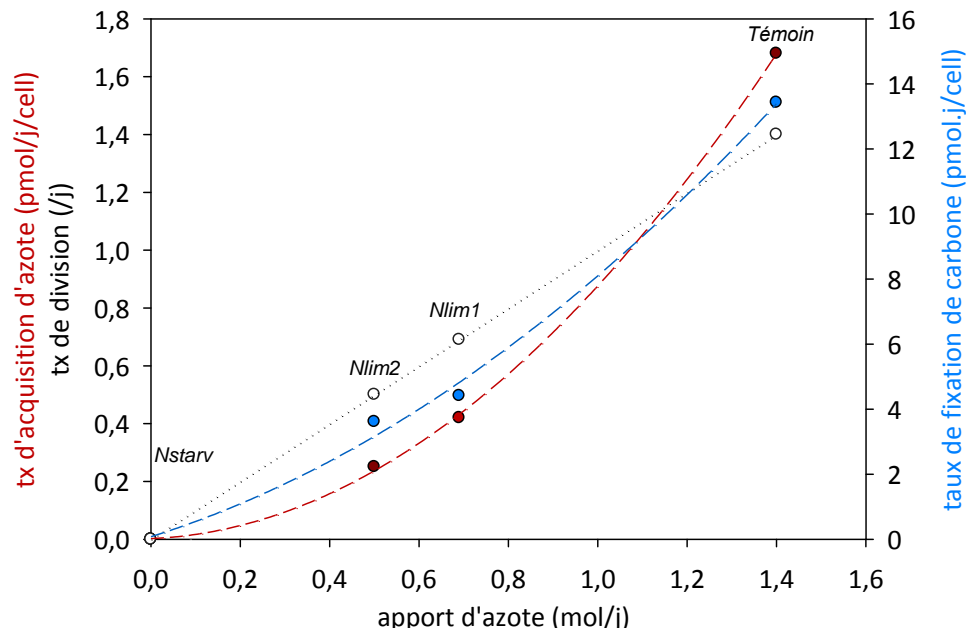


Figure 77. Taux d'acquisition d'azote, de fixation de carbone et de division en fonction de l'apport d'azote (expériences témoin, Nlim1 et Nlim2). Données moyennées sur chaque expérience.

→ Ainsi, les statuts nutritionnel et énergétique sont les moteurs principaux de l'acquisition d'azote à court et moyen termes. En dehors d'une limitation azotée, la majeure partie de l'azote est acquise de jour et sa cinétique est liée à l'intensité lumineuse instantanée. Cependant, la mitose interfère à l'échelle horaire, comme le montre la non linéarité entre acquisition d'azote et lumière lorsqu'une proportion significative de la population est en mitose. La nuit, l'acquisition d'azote est fonction du quota en sucres, et cette relation est également affectée quand le signal de mitose est positif.

Quand l'azote est limitant, sa cinétique d'acquisition est comparable de jour comme de nuit, et est inversement proportionnelle au rapport N/C. L'effet de la mitose n'a pas été observé car la population est faiblement synchronisée.

Chapitre VII

Modéliser le cycle cellulaire permet-il de mieux représenter les flux de matière dans l'océan ?



David and Goliath, by Bodnar

VII. Prise en compte du cycle cellulaire dans la modélisation de la croissance phytoplanctonique

1. Modéliser la croissance phytoplanctonique

1.1. La modélisation mathématique de systèmes biologiques

Un modèle mathématique est une idéalisation de la réalité à des fins descriptives pour comprendre des processus, ou prédictives pour anticiper l'évolution d'un système. Un modèle doit partager certaines ressemblances avec le système réel tout en le simplifiant. Il résulte du choix d'un niveau de complexité et d'une échelle de représentation (cellule, organisme, population, groupes fonctionnels...) qui fixe le niveau de détail et l'échelle temporelle des processus.

Les modèles de population ou d'écosystèmes peuvent se baser sur l'analyse des flux entre compartiments fonctionnels. Cette technique permet de suivre l'évolution globale d'une population ou d'un groupe fonctionnel. Au contraire de ces modèles qui ne décrivent que des évolutions globales, la représentation basée sur l'individu ('IBM', pour 'individual based modeling') permet de rendre compte des comportements interactifs entre individus. Elle est cependant coûteuse en temps de calcul et plus difficile à valider (Coquillard & Hill 1997). En effet, la validation fine d'un modèle IBM requiert des observations à l'échelle de la cellule, ce qui s'avère difficile dans le cas des microalgues.

1.2. Les modèles de croissance et d'écosystème

Les modèles d'écosystèmes représentent des flux de matière entre compartiments. Les modèles de type 'NPZD' agrègent la matière en groupes fonctionnels, ou compartiments. Le vivant peut être discrétisé en Phytoplancton autotrophe (P) et Zooplancton hétérotrophe (Z) et le non vivant en Nutriments (N) et Détritus (D) (Fasham 1995). En fonction du but du modèle, et donc de ce qu'il doit représenter, ces compartiments peuvent être subdivisés, par exemple en diatomées et flagellés en ce qui concerne le phytoplancton. Chaque compartiment peut également représenter plus ou moins de processus. Ainsi, la croissance du phytoplancton peut être liée uniquement à la concentration en un nutriment (modèle de Monod) ou être fonction du statut physiologique. Le modèle de Droop prend en compte un quota en azote, d'autres approches représentent le pool

pigmentaire ou les ressources énergétiques de la cellule (Shuter 1972, Geider et al. 1998, Zonneveld 1998).

La tentation du détail et de la complexification peut être grande, dans un but louable de représenter le plus grand nombre de mécanismes agissant sur un système naturel. Il a cependant été démontré qu'une augmentation de la complexité d'un modèle n'améliore pas forcément la représentation du système (Arhonditsis & Brett 2004). Il est important de noter qu'à l'inverse des modèles physiques, il n'existe pas de loi universelle représentant les processus biologiques. Ceux-ci sont donc représentés par des formulations mathématiques empiriques. L'ajout de paramètres difficilement identifiables par l'expérience ou l'observation tend à introduire des incertitudes. De plus, augmenter le nombre de liens entre variables complique l'analyse du système. En d'autres termes, plus le modélisateur rajoutera des variables et des paramètres et plus il lui sera difficile de prévoir les conséquences de leur modification.

1.3. La croissance du phytoplancton modélisée

En 1946, Riley représente mathématiquement la production primaire en la reliant à un taux de croissance (μ), un taux de respiration (R) et au broutage par le zooplancton lui-même lié à un taux de broutage (g) et à la densité d'organismes brouteurs (Z).

$$\frac{dP}{dt} = P(\mu - R - gZ)$$

Toute la question est donc d'identifier les facteurs principaux qui gouvernent μ . Une fois les facteurs identifiés, nous devons représenter leur impact sur la croissance sous forme de fonction ($f_{lim1} \cdot f_{lim2}$). En supposant que les différentes limitations agissent simultanément sur la croissance, nous pourrions les multiplier : $\mu = \mu_{max} \cdot f_{lim1} \cdot f_{lim2}$. Si au contraire nous supposons que la croissance résulte du contrôle exclusif de l'élément le plus limitant, nous pourrions ne retenir que sa fonction : $\mu = \mu_{max} \cdot \min(f_{lim1}, f_{lim2}, \dots)$. Cependant, ce type de représentation simple ne permet pas de prendre en compte de possibles interactions plus complexes entre éléments limitants, telles qu'entre la lumière et l'azote.

1.3.1. Modèles prenant en compte le statut physiologique

Dans le but de représenter les interactions possibles entre éléments limitants, le statut physiologique du phytoplancton peut être formalisé en prenant en compte des réserves énergétiques et/ou le quota en azote ou en pigments.

De nombreux modèles représentent le pool pigmentaire afin de représenter le phénomène de photoacclimatation sur la croissance du phytoplancton (augmentation du pool pigmentaire

lors d'une diminution de la dose de lumière, Le Floch 2002). Ainsi, le modèle empirique de Cloern *et al.* (1995) représente l'évolution du ratio Chla/C en fonction de variables forçantes telles que la température et l'apport en azote et lumière. D'autres modèles intègrent cette représentation pour modéliser la croissance phytoplanctoniques, en séparant les quotas en azote et carbone (Zonneveld 1998, Figure 78), en séparant le pool pigmentaire du reste du pool d'azote (Geider *et al.* 1998), voir en représentant des échanges dynamiques entre ces deux pools (Pawlowski 2004). L'idée d'échanges dynamiques avait déjà été proposé dans le modèle de Shuter (1979), qui représente l'affectation dynamique des réserves internes d'azote et de carbone à des fonctions particulières (machinerie somatique, structure, photosynthèse). Enfin, le modèle de Flynn (2001) permet de prendre en compte différents types de limitation et leur interactions.

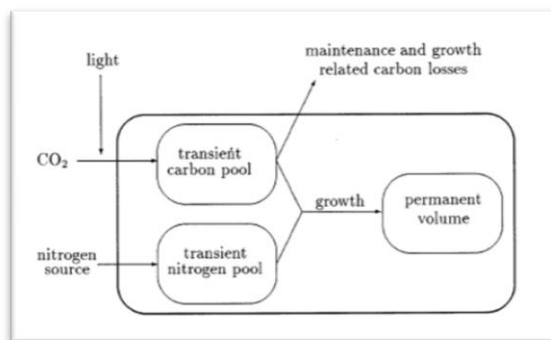


Figure 78. Modèle de Zonneveld (1998). Carbone et azote sont représentés en tant que nutriment et pool organique agissant sur la croissance.

1.3.2. Modèles de cycle cellulaire

La notion de cycle cellulaire peut également être incluse dans la modélisation de la croissance phytoplanctonique. Arino et Kimmel (93) confrontent deux approches de la dynamique des populations. Toutes deux sont basées sur l'évolution d'un descripteur tel que la taille ou la concentration en un composé interne dit 'mitogène'. L'approche de base consiste en la répllication d'un individu en deux cellules filles quand le descripteur a atteint un seuil critique. La notion de cycle cellulaire intervient dans l'évolution de ce descripteur qui est lié à l'avancement du cycle cellulaire. A cette vision, les auteurs ajoutent une approche individu-centrée où chaque division crée deux nouvelles entités différentes, générant ainsi de la variabilité interindividuelle. La durée du cycle de chaque individu dépend de la valeur du descripteur à la 'naissance' de la cellule.

Quelques années plus tard, Pascal et Caswell (1997) lient la vitesse d'avancement d'une partie du cycle cellulaire à l'état nutritionnel (Figure 79). Dans le reste du cycle, l'avancement est constant. De façon analogue, Vaulot et Chisholm (87) relie l'avancement d'une partie du cycle à la lumière, en reprenant l'hypothèse de Spudich et Sager (80) supposant l'existence d'un segment dépendant à la lumière.

Une segmentation plus fine du cycle cellulaire est représenté par Tyson et Hannsngen (86), où la durée des différentes phases du cycle sont déterministes (lié à la taille ou à une durée fixe) ou probabilistes (Figure 80).

Hellweger (2008) teste numériquement l'hypothèse d'une 'mémoire inter générationnelle' liant inversement la durée des cycles des cellules mères et filles en utilisant le concept de *gating* (Cf. Chapitre 0.4 p110). La division des cellules est supposée possible uniquement pendant une 'fenêtre d'opportunité' quotidienne. Si la cellule a acquis la taille requise, elle se divise. Sinon, la croissance continue jusqu'à la fenêtre suivante, ce qui produit *in fine* une cellule plus grosse. Celle-ci engendrera deux cellules filles relativement grosses, qui boucleront leur cycle en moins de temps que la cellule mère.

Dans la suite du chapitre, nous représenterons les conséquences du passage en mitose sur l'acquisition d'azote et la croissance de la cellule. Nous intégrerons les hypothèses formulées dans les chapitres précédents en augmentant au fur et à mesure la complexité du schéma conceptuel. Enfin, nous comparerons la représentativité et la complexité des différents modèles proposés.

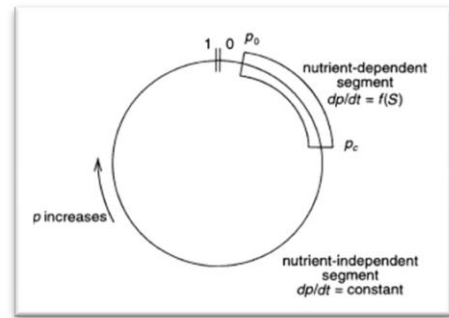


Figure 79. Représentation du cycle cellulaire selon Pascual & Caswell 1997.

L'avancement dp/dt dépend de la concentration en nutriment au début du cycle puis devient indépendant des conditions extérieures au delà.

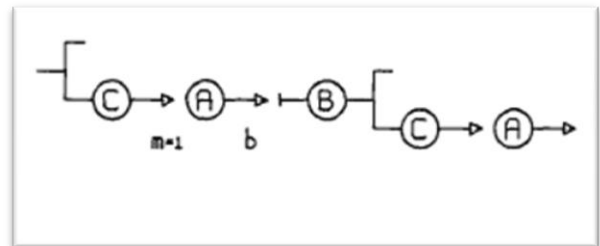


Figure 80. Représentation du cycle cellulaire selon Tyson & Hannsngen 1986. L'avancement dans la première phase 'C' est lié à la taille cellulaire, puis à une variable probabiliste dans la phase 'A' et la durée de la phase 'B' est fixe.

2. Construire un modèle simple

2.1. Construire un schéma conceptuel

Nous allons, dans un premier temps, tenter de représenter le comportement du métabolisme de croissance de *Thalassiosira weissflogii*, particulièrement la prise d'azote, à partir d'un modèle simple. Nous avons choisi une représentation de la dynamique de la population basée sur les flux de matière.

Nous devons tout d'abord identifier les facteurs les plus importants agissant sur les processus d'acquisition d'azote. L'effet de la disponibilité en nutriment est souvent représenté par une fonction saturante. Dans nos expériences, nous avons pu constater que le taux d'acquisition d'azote n'est pas lié à la concentration en nutriment quand sa concentration est submicromolaire. Dans l'expérience *témoin*, c'est la variation diurne de l'intensité lumineuse qui est responsable de la variabilité observée, soulignant l'importance du statut physiologique sur la prise d'azote (Figure 81). Les observations faites dans le chapitre VI vont nous permettre de représenter l'effet des conditions extérieures et du statut physiologique des cellules sur la prise d'azote et la croissance.

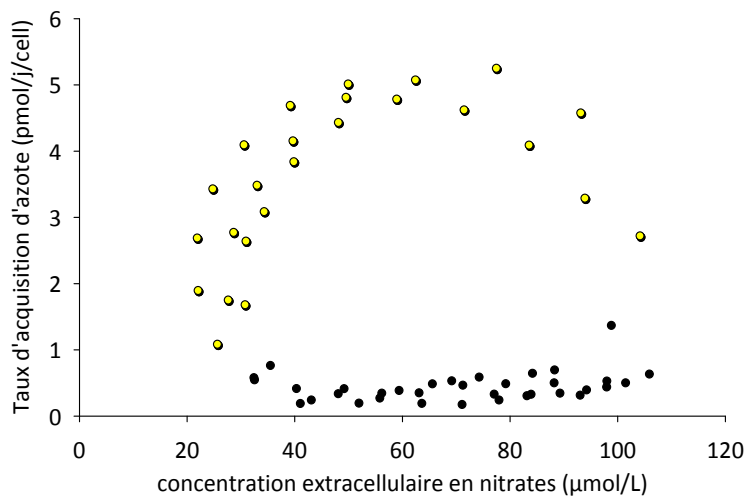


Figure 81. Relation entre le taux d'acquisition d'azote et la concentration en nitrate dans la culture au cours de l'expérience *témoin*. Les mesures effectuées de jour sont symbolisées par des points jaunes et celles de nuit par des points noirs.

Dans notre modèle (Équations 4), le processus de fixation de carbone (μ) est directement dépendant du quota en azote (Q) selon le modèle de Droop et du flux de photons (L). L'acquisition d'azote (ρ) dépend quant à elle de la concentration extracellulaire en substrat azoté (S). Néanmoins, l'absorption cesse lorsque les cellules ont atteint un certain quota N/C limite (Q_{max}).

$$\mu = \bar{\mu} \left(1 - \frac{Q_{\min}}{Q} \right) \left(\frac{L}{L + k_L} \right)$$

$$\rho = \rho_{\max} \frac{S}{S + k_S} \left(1 - \frac{Q}{Q_{\max}} \right)$$

Équations 4. Processus de fixation de carbone et d'acquisition d'azote du modèle *LDBiom*

La dynamique de la population est alors représentée par un modèle à trois compartiments : nutriment azoté (S), azote cellulaire (N) et carbone cellulaire (C). Nous faisons l'hypothèse que le carbone n'est jamais limitant. Les variations au sein des compartiments (\dot{C} , \dot{S} , \dot{N} Équations 5) sont donc causées par les processus d'acquisition de carbone et d'azote et par la dilution (D).

$$\dot{C} = \mu(Q, L)C - DC = (\mu(Q, L) - D)C$$

$$\dot{S} = DS_{in} - DS - \rho(Q, L)C = D(S_{in} - S) - \rho(Q, L)C$$

$$\dot{N} = \rho(Q, L)C - DN$$

Équations 5. Equations différentielles du modèle *LDBiom*

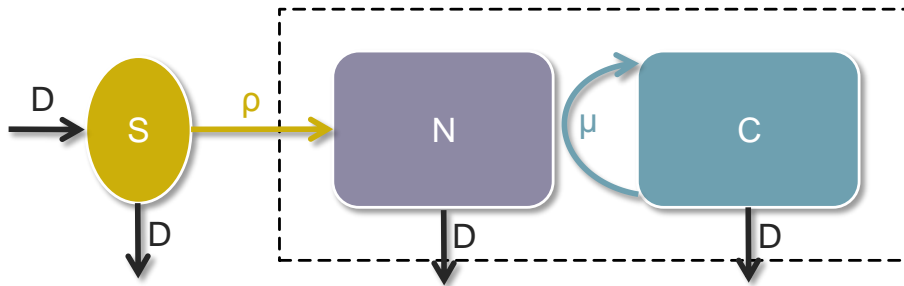


Schéma 1. Modèle *LDBiom*. Variables: S = substrat, N = azote cellulaire, C = carbone. Processus: D = dilution, ρ = acquisition d'azote, μ = fixation de carbone.

Nous attirons l'attention du lecteur sur le fait que μ représente ici le taux de fixation de carbone (= taux de croissance) et non le taux de division de la population.

2.2. Résultats et comparaison aux données

Le modèle *LDBiom* est simulé dans les conditions de lumière et d'azote des différentes expériences discutées dans les chapitres précédents (conditions en p72). Dans un premier temps, les paramètres du modèle sont fixés par nos observations ou la littérature. Ils sont ensuite ajustés pour représenter au mieux les données des différentes expériences. Le même jeu de paramètre est utilisé pour représenter l'ensemble des expériences.

2.2.1. Conditions non limitantes, expérience témoin

A l'équilibre, les sorties du modèle *LDBiom* sont en phase avec les variations diurnes du carbone cellulaire de l'expérience *témoin* (Figure 82A p155). Le niveau moyen est légèrement sous estimé du fait que le maximum diurne est lui-même sous estimé. Les variations de l'azote cellulaire sont correctement représentées en amplitude mais leur phase est retardée de quelques heures (Figure 82B). De la même façon, les nitrates sont représentés correctement en termes d'amplitude de variation mais la disparition d'azote commence trop tard par rapport aux données (Figure 82C). Au final, le rapport N/C est assez bien représenté en moyenne et en amplitude (Figure 82D) mais est légèrement décalé dans le temps par rapport aux données de l'expérience *témoin*.

2.2.2. Conditions limitantes en azote, expérience *Nlim*

Le modèle *LDBiom* simulé dans les conditions de l'expérience *Nlim* après acclimatation en conditions *témoin* représente une augmentation transitoire de la concentration en carbone cellulaire dans le bioréacteur (Figure 83A p156). Cette évolution, consécutive à la diminution du taux de dilution est observée dans les données mais la moyenne à l'équilibre est (faiblement) surestimée. La perte d'oscillation d'azote cellulaire en conditions limitantes en azote est cohérente avec les données (Figure 83B). Elle découle du fait que l'azote total dans le bioréacteur correspond quasi uniquement à l'azote cellulaire, puisqu'il n'y a jamais d'accumulation de substrat dans la culture (Figure 83C). La concentration d'azote cellulaire suit donc la concentration en azote du milieu de renouvellement. Au final, le quota N/C est correctement représenté en amplitude et niveau moyen (Figure 83D). Le décalage de la phase observé en condition *témoin* disparaît lors de la limitation par l'azote puisque les variations du ratio N/C sont dues uniquement aux variations du carbone.

2.2.3. Conditions limitantes en lumière, expérience *Llim*

Après acclimatation dans les conditions de l'expérience *témoin*, nous simulons *LDBiom* lors d'une limitation par la lumière. La diminution du carbone cellulaire, causée par la diminution de la dose de lumière, est correctement représentée par le modèle (Figure 84A p 157). Le modèle représente ensuite une réaugmentation du carbone cellulaire après la diminution du taux de dilution au milieu du jour 16 (j16,5). Une semaine plus tard, les valeurs observées sont surestimées. L'azote cellulaire, et le carbone dans une plus faible mesure, sont surestimés tout au long de l'expérience, même en conditions *témoin* (Figure 84B). Cette constatation suggère qu'un élément non pris en compte a pu limiter la croissance. Le comportement du substrat est globalement bien représenté, avec une augmentation due à la diminution de la biomasse suivie d'une diminution liée à la diminution du taux de dilution (Figure 84C). Les oscillations sont correctement représentées mais le

niveau moyen est alternativement sur- ou sous-estimé. Au final, le quota en azote est surestimé et les oscillations clairement observées dans le modèle sont de plus faibles amplitudes dans les données.

2.2.4. *Passage en lumière continue, expérience CL*

Simulé dans les conditions de l'expérience *CL*, le modèle *LDBiom* représente l'augmentation du carbone cellulaire dans le bioréacteur, causée par l'augmentation de la dose de lumière en lumière continue. En particulier, la phase (période de forte augmentation et plateau) est correctement reproduite (Figure 85A p158). Le niveau moyen est cependant surestimé à la fin de la phase d'illumination continue. L'augmentation concomitante de la concentration en azote cellulaire est bien reproduite en termes de niveau moyen mais les oscillations diurnes observées dans les données ne sont pas reproduites par le modèle (Figure 85B). Le comportement saccadé du substrat, cohérent est avec les données. Il est dû aux injections de nitrates dans la culture afin de prévenir toute limitation en azote (Figure 85C). Enfin, le ratio N/C est correctement représenté en valeur moyenne mais les (faibles) oscillations observées dans les données ne sont pas reproduites par le modèle (Figure 85D).

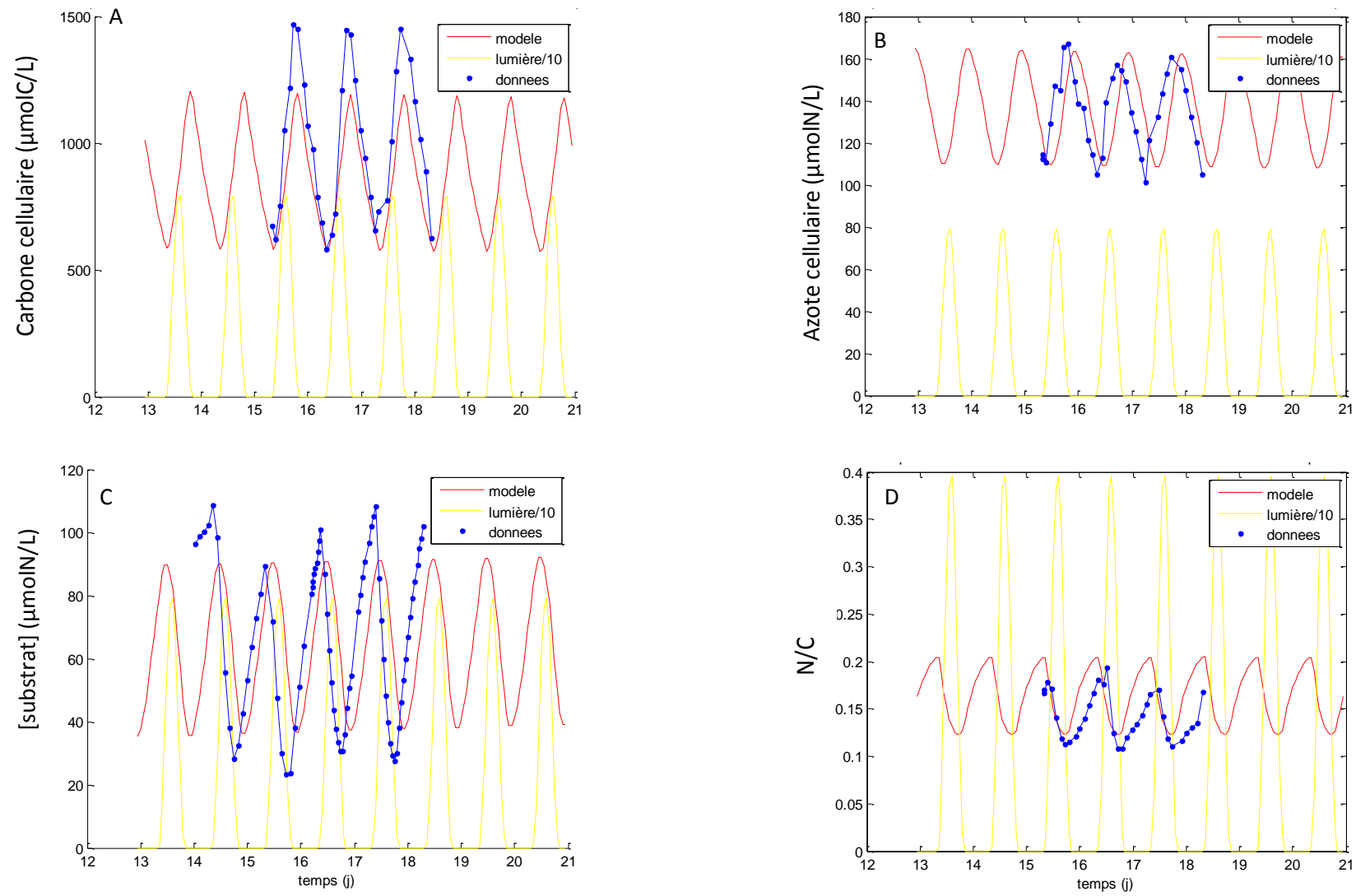


Figure 82. Résultats du modèle *LDBiom* appliqué aux conditions de l'expérience *témoin*.

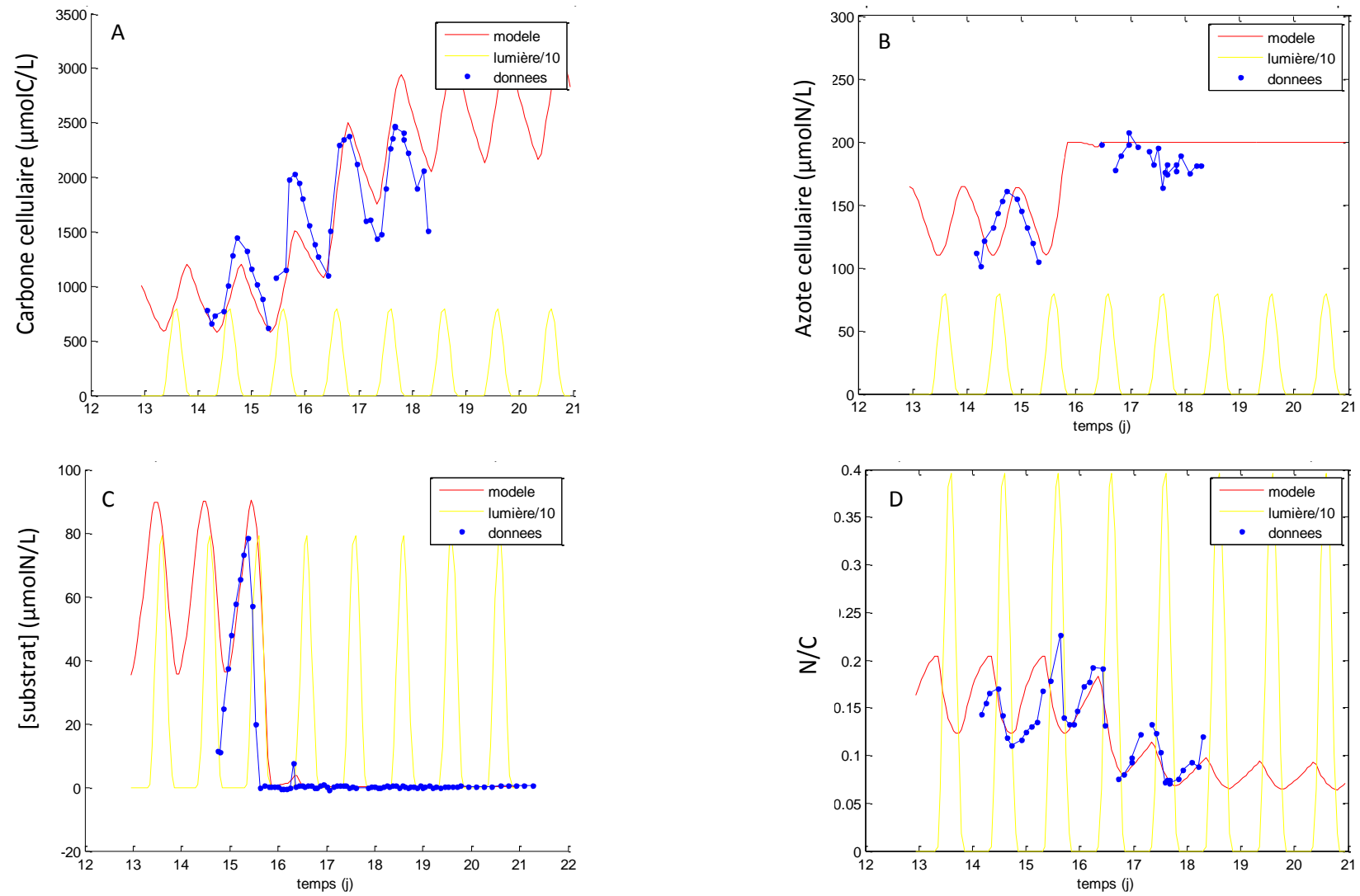


Figure 83. Résultats du modèle *LDBiom* appliqué aux conditions de l'expérience *Nlim1*.

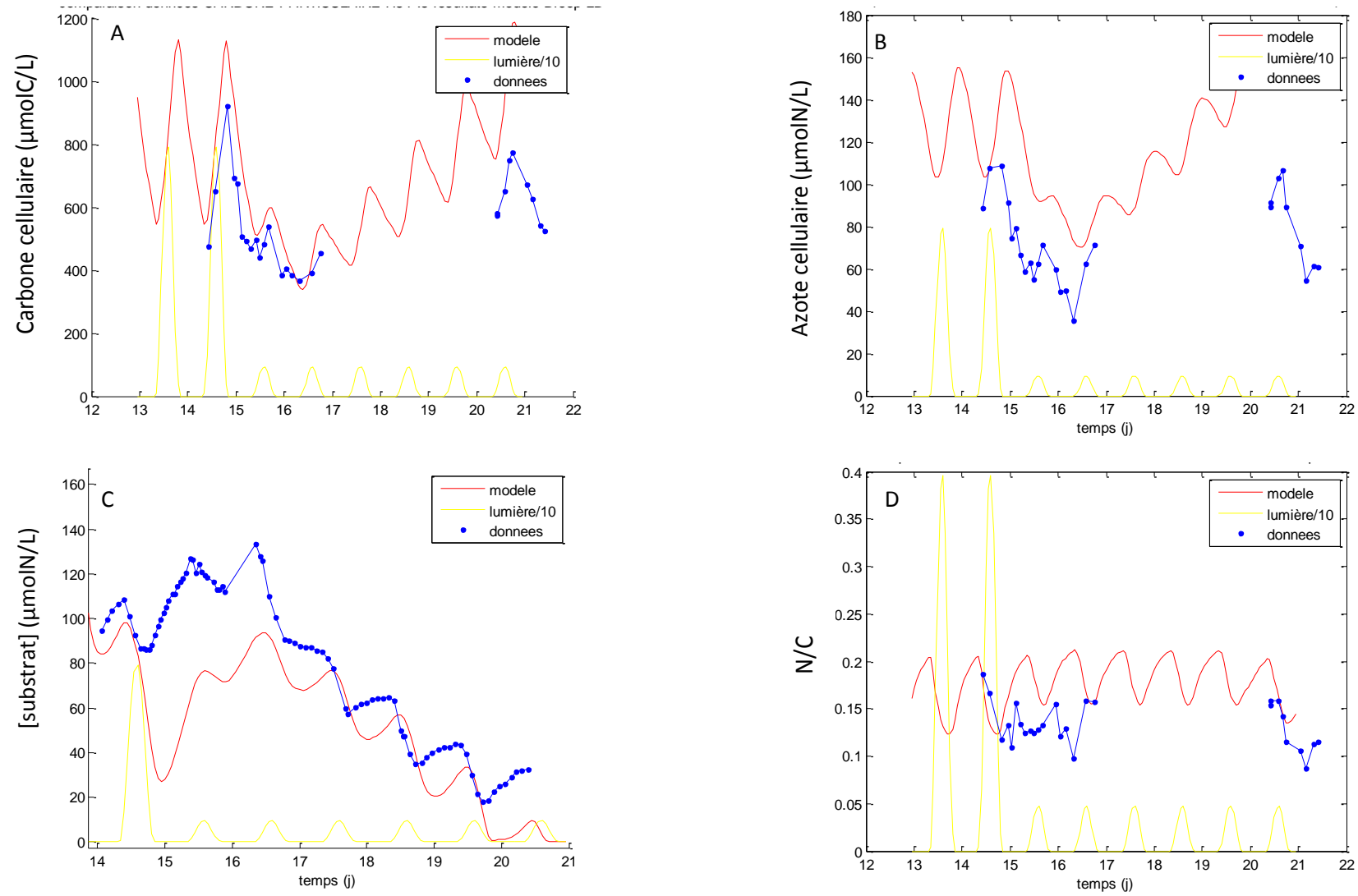


Figure 84. Résultats du modèle *LDBiom* appliqué aux conditions de l'expérience *Llim1*.

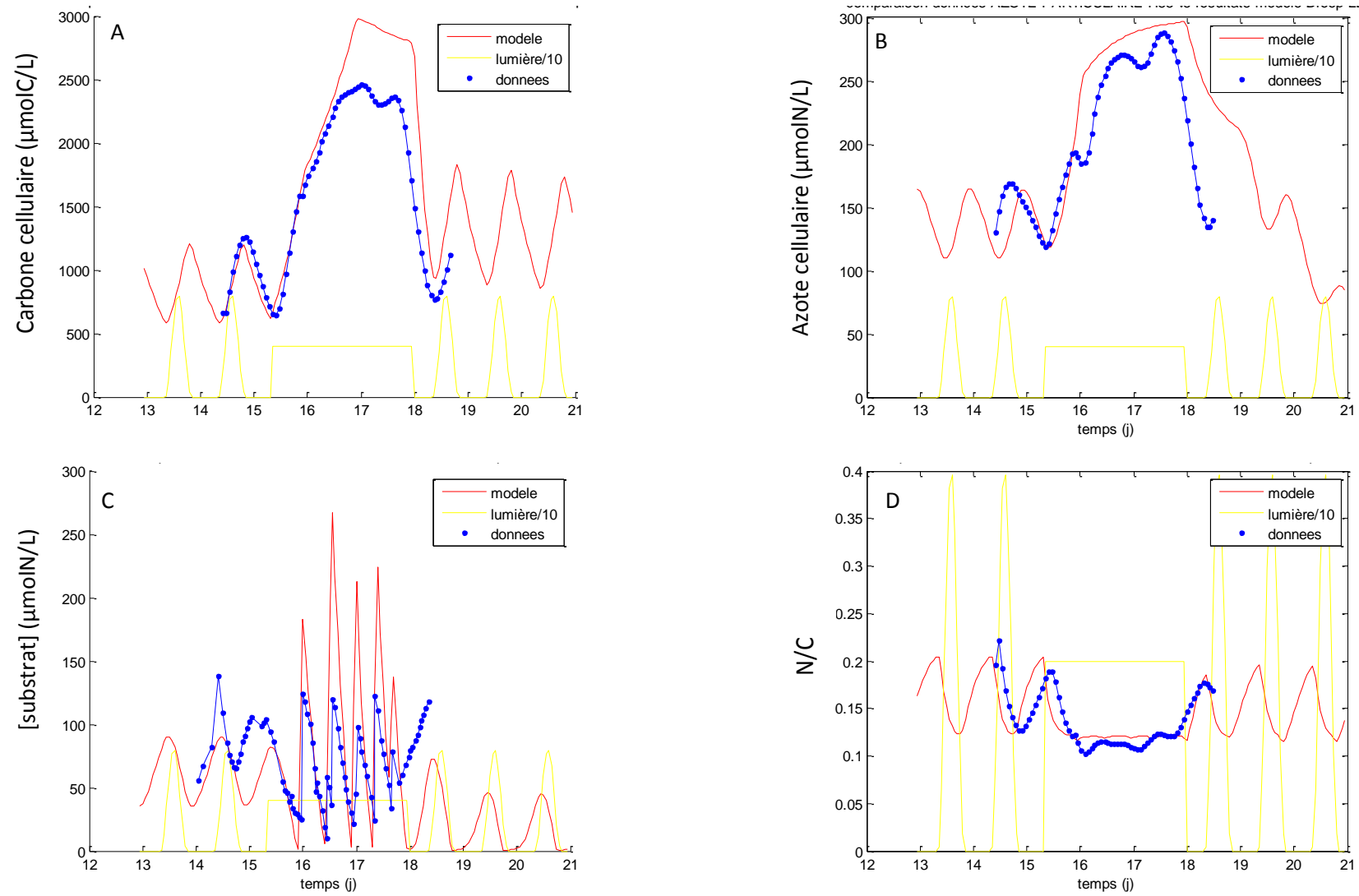


Figure 85. Résultats du modèle *LDBiom* appliqué aux conditions de l'expérience *CL*.

3. Prendre en compte le cycle cellulaire

3.1. Construction d'un nouveau modèle à partir des insuffisances du modèle *LDBiom*

La simplicité du modèle précédent ne lui permet pas de représenter correctement la phase de la prise d'azote à l'échelle horaire, ni de maintenir les oscillations diurnes d'acquisition d'azote dès lors que l'éclairement devient continu. Nous voulons maintenant tester si la prise en compte du cycle cellulaire permet de résoudre ces problèmes.

Dans le chapitre III, nous avons mis en évidence une nette diminution de l'acquisition d'azote lorsque la population était principalement en mitose. Nous allons donc supposer que les cellules n'acquièrent pas d'azote quand elles sont dans la phase M. Nous considérons un modèle représentant plusieurs états clés du cycle. Nous voulons représenter les points de contrôle, identifiés dans le chapitre IV, en G1 sur le statut nutritionnel et en G2 sur le statut énergétique. L'avancement dans le cycle étant lié aux conditions nutritionnelles et énergétiques, nous avons également voulu représenter les points de contrôle identifiés en G1 sur le statut nutritionnel et en G2 sur le statut énergétique. Au final, trois états sont représentés, correspondant schématiquement aux phases G1, G2 et M. La phase S n'est pas explicitement représentée car nous ne lui avons pas identifié de rôle particulier dans le contrôle du processus d'acquisition d'azote. En dehors de l'impact du cycle cellulaire, nous restons dans l'esprit d'un modèle à quota où, dans chaque phase, la prise d'azote et de carbone dépendent aussi du ratio N/C.

Chaque état du cycle cellulaire est donc décrit selon un principe similaire à celui décrit précédemment pour le modèle *LDBiom* à la différence qu'il n'y a pas d'acquisition d'azote dans l'état M. (Equations 6, Schéma 2). Le taux de passage entre chaque état (σ_{12} , σ_{2M} et σ_{M1}) est lié au statut physiologique (Equations 7). Ainsi, le passage entre les états 1 et 2 est lié au quota en azote selon une représentation de Droop et le passage entre les états 2 et M est lié à la dose de lumière reçue par la cellule

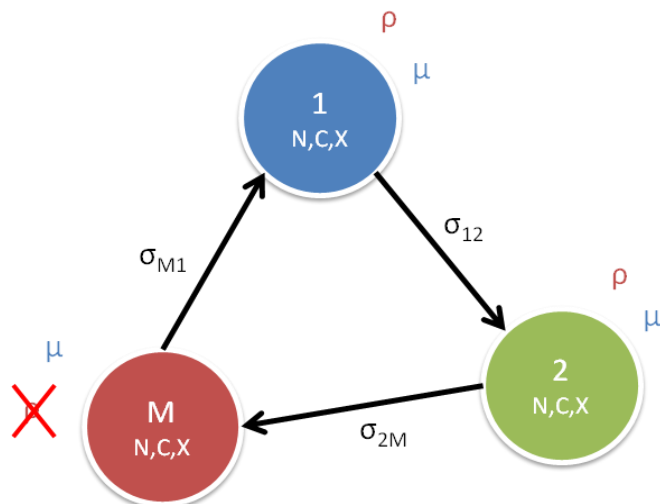


Schéma 2. Modèle FreeCycle. Les trois compartiments représentent trois états du cycle cellulaire dont le taux de passage est lié aux conditions environnementales. L'acquisition de matière dans les différents états est représentée par des sous modèles de type *LDBiom*. L'acquisition d'azote est nulle en M.

depuis la précédente division (temps de génération) selon une fonction à seuil. Le taux de sortie de M est indépendant des conditions de croissance.

$$\mu_{\psi} = \bar{\mu} \left(1 - \frac{Q_{\min}}{Q_{\psi}} \right) \left(\frac{L}{L + k_L} \right)$$

Équation 6. Processus de fixation de carbone et d'acquisition d'azote dans le modèle FreeCycle. ψ = état 1, 2 ou M.

$$\rho_{\psi} = \rho_{\max} \frac{S}{S + k_S} \left(1 - \frac{Q_{\psi}}{Q_{\max}} \right)$$

sauf $\rho_M = 0$

$$\sigma_{12} = \sigma_{12m} \left(1 - \frac{Q_{\min}}{Q_1} \right)$$

$$\sigma_{2M} = \sigma_{2Mm} \frac{\bar{I}^4}{\bar{I}^4 + k_{Ld}^4}$$

$$\sigma_{M1} = \sigma$$

Équations 7. Equations des processus reliant les différents états du modèle FreeCycle

Au final, le bilan de masse prenant en compte ces processus aboutit au modèle présenté dans les Équations 8. Une équation supplémentaire représente le nombre de cellules (X) à partir de l'hypothèse que le contenu en carbone avant division ($Q_{C_{\max}}$) est fixe quelque soit les conditions de croissance. Dans ce cas, la variation du nombre cellules (\dot{X}) provient du doublement du nombre de cellules passant entre les états M et 1, calculé à partir du carbone en M ($X_M = C_M / Q_{C_{\max}}$).

$$\dot{C}_1 = C_1(\mu_1 - D - \sigma_{12}) + \sigma_{M1}C_M$$

$$\dot{N}_1 = C_1\rho_1 - N_1(D - \sigma_{12}) + \sigma_{M1}N_M$$

$$\dot{C}_2 = C_2(\mu_2 - D - \sigma_{2M}) + \sigma_{12}C_1$$

$$\dot{N}_2 = C_2\rho_2 - N_2(D - \sigma_{2M}) + \sigma_{12}N_1$$

$$\dot{C}_M = C_M(\mu_M - D - \sigma_{M1}) + \sigma_{2M}C_2$$

$$\dot{N}_M = -N_M(D - \sigma_{M1}) + \sigma_{2M}N_2$$

$$\dot{S} = -\rho_1C_1 - \rho_2C_2 + D(S_{in} - S)$$

$$\dot{X} = 2\sigma_{M1}X_M - DX$$

Équations 8. Equations différentielles reliant les différentes variables du modèle FreeCycle. L'équation du nombre de cellules n'intervient pas dans le calcul des autres variables.

3.2. Résultats et comparaison aux données

Comme pour le schéma précédent, le modèle *FreeCycle* a été paramétré en fonction des données mesurées dans nos expériences. Les paramètres impossibles à approcher, comme les taux

de passage entre états du cycle (σ_{12} , σ_{2M} et σ_{M1}) ont été fixé grâce à une analyse de sensibilité (Cf. Annexe p220). Un unique jeu de paramètre est utilisé pour représenter les différentes expériences.

3.2.1. Conditions non limitantes, expérience témoin

La Figure 86A montre l'évolution du cycle cellulaire moyen de la population simulé à l'échelle horaire. Le pourcentage de cellules en G2 (pG2) augmente au cours de la nuit, à cause du point de blocage entre G2 et M sur la dose de lumière, puis la population passe massivement en M après quelques heures de jours. Le taux de passage entre G2 et M est volontairement élevé, afin de générer un évènement majeur de mitose quotidien capable d'influencer l'acquisition d'azote au niveau de la population. Le pourcentage de cellules en G1 (pG1) augmente après la mitose, c'est-à-dire en seconde partie de journée, et diminue après que le ratio N/C a atteint une valeur seuil. Notons que la valeur de la concentration en azote (et carbone) cellulaire dans la population est, à tout moment, la somme de l'azote (et du carbone) contenu dans les cellules des états 1, 2 et M (Figure 86B).

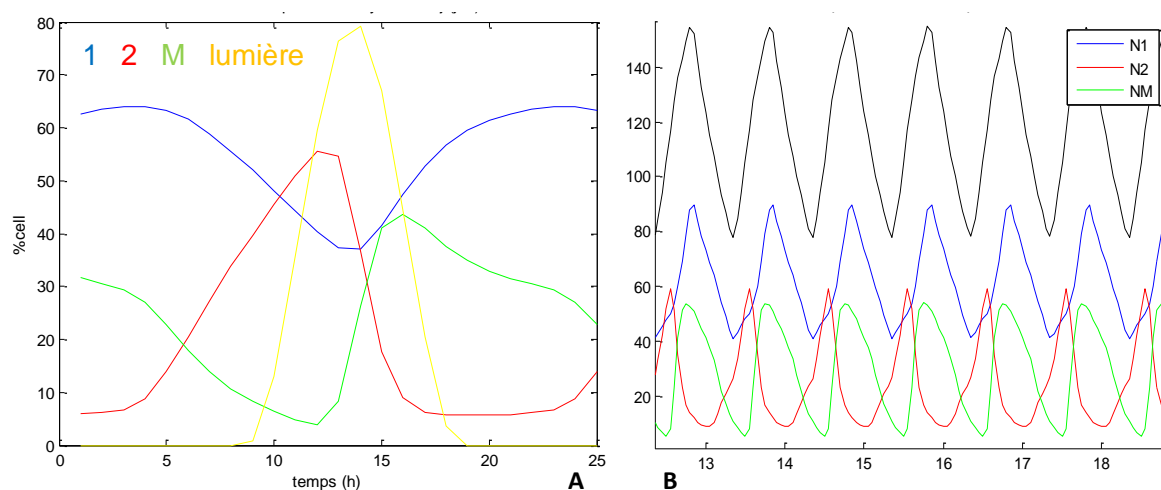


Figure 86. Résultats du modèle en termes de cycle cellulaire (A, part de la population dans les différentes phases du cycle sur 24h), et de concentration en azote cellulaire dans la population (B, oscillation de l'azote cellulaire total [noir] et part contenue dans les différentes phases du cycle [couleurs] sur une semaine)

Le modèle *FreeCycle* représente correctement les oscillations diurnes du carbone et de l'azote cellulaire en termes de phase, de niveau moyen et d'amplitude (Figure 89A et B). Le substrat n'est plus consommé au crépuscule à cause de l'évènement majeur de mitose au niveau de la population (Figure 89C). Le quota en azote est donc également correctement simulé (Figure 89D). L'avancement simulé du cycle cellulaire correspond à ce qui est observé dans les données, puisque le pG1 est représenté correctement en phase, amplitude et niveau moyen (Figure 89E). Enfin, le

nombre de cellules, calculé à partir du contenu cellulaire en carbone mesuré en fin de phase G2/M en conditions *témoin*, représente correctement les oscillations mesurées (Figure 89F).

3.2.2. Conditions limitantes en azote, expérience Nlim

Le modèle *FreeCycle* représente l'augmentation du carbone et de l'azote cellulaire lors de la diminution du taux de dilution, mais tout comme avec le modèle *LDBiom* l'augmentation du carbone est légèrement surestimée (Figure 93A et B). La diminution du quota en azote est également bien représentée, même si elle est surestimée (Figure 93D). Après la diminution du taux de dilution (j15), le pG1 diminue légèrement dans les données puis augmente à partir du 3^e jour pour dépasser le niveau *témoin* après une semaine en conditions limitantes. Le modèle ne peut rendre compte de la diminution en début de limitation, mais représente bien l'augmentation du pG1 moyen après quelques jours (Figure 93E). Cependant, la phase du cycle est conservée dans le modèle alors qu'elle apparaît décalée dans les données. Enfin, l'augmentation du nombre de cellules prévue par le modèle a bien lieu en réalité mais dans une plus faible mesure (Figure 93F), suggérant un découplage entre croissance et division lorsque la croissance est limitée par l'azote (Dubinsky & Berman-Frank 2001).

3.2.3. Conditions limitantes en lumière, expérience Llim

La diminution de la dose de lumière cause dans le modèle un ralentissement du passage entre G2 et M et donc une augmentation du pG2 moyen dans la population (Figure 87). La diminution du pG1 associée est bien observée dans les données (Figure 93E p168), et les oscillations du nombre de cellules prévues par le modèle sont proches de la réalité (Figure 93F). Au niveau des flux de matière, le modèle prévoit une diminution du carbone et de l'azote cellulaires au cours du premier jour (Figure 93A et B). Cette diminution, observée dans les données, est due à la diminution de la dose de lumière. La subséquente augmentation, également observée, est due à la diminution du taux de dilution.

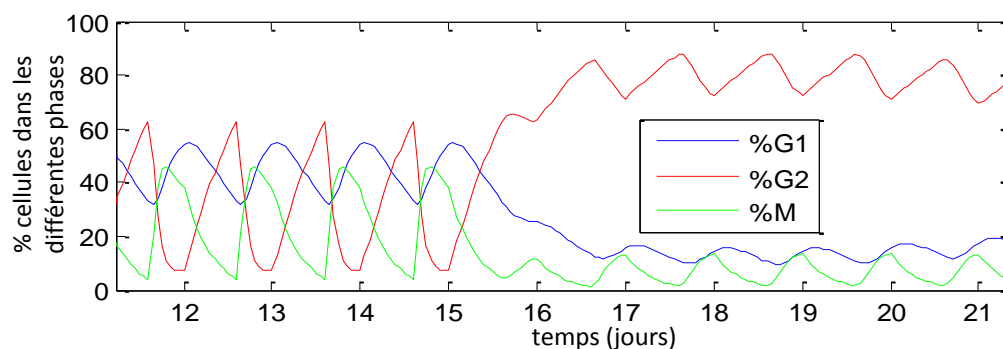


Figure 87. Pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle simulé par le modèle *FreeCycle* appliqué lors de l'instauration d'une limitation par la lumière (conditions *Llim*).

3.2.4. Passage en lumière continue, expérience CL

Nous allons maintenant tester notre modèle lors du passage d'une lumière diurne à continue. Le cycle cellulaire atteint un équilibre stable après 12h en lumière continue (Figure 88), contrairement à ce qui est observé dans les données (Figure 92E). Au cours des 12h premières heures, le pic de mitose à la fin du jour 15 entraîne une inflexion sur l'azote cellulaire, comme observée dans les données (Figure 92B). Ensuite, l'accumulation d'azote cellulaire n'est plus influencée par le cycle et la deuxième inflexion mesurée n'est pas simulée. Le modèle prévoit une augmentation continue du nombre de cellules, au contraire de ce qui est observé.

Avec ce modèle, nous voulions tester si la prise en compte du cycle cellulaire permettait de mieux représenter les oscillations d'acquisition d'azote, notamment sous illumination continue. Dans nos expériences, nous avons lié ces oscillations à des passages massifs de la population en mitose. Or, le cycle cellulaire ne montre pas d'évolution au-delà d'une demi-journée sous illumination continue. En conséquence, l'impact de la mitose au deuxième jour de lumière continue ne peut être représenté dans le modèle *FreeCycle*. Nous chercherons dans le paragraphe suivant à résoudre ce problème.

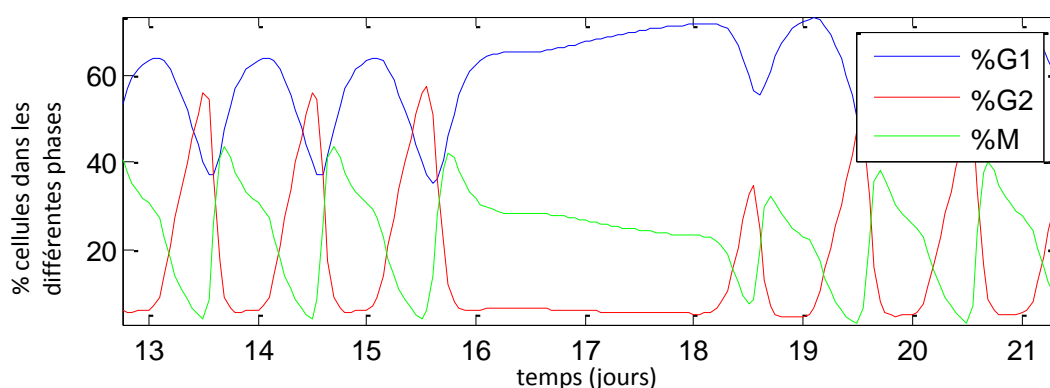


Figure 88. Pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle simulé par le modèle *FreeCycle* appliqué aux conditions CL.

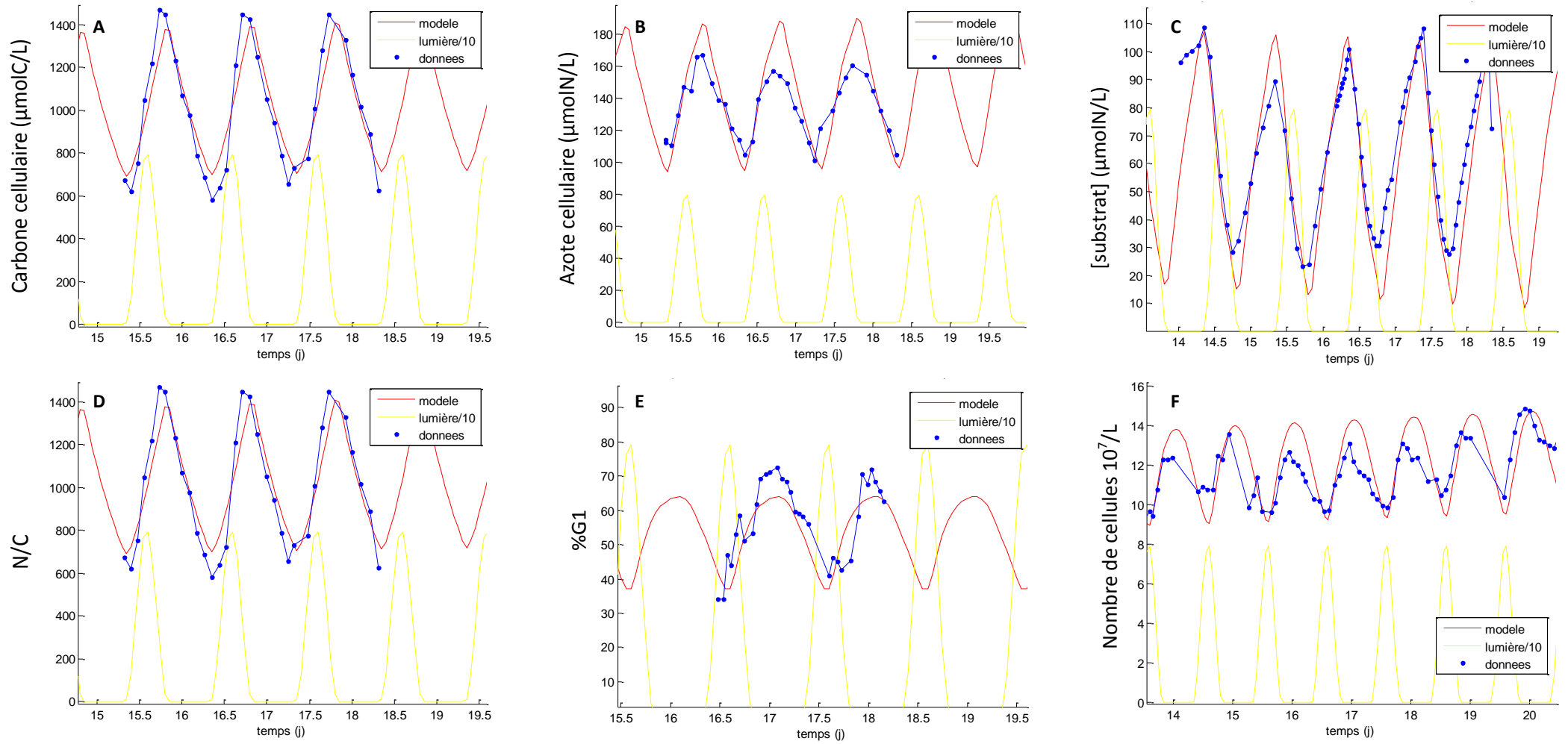


Figure 89. Résultats du modèle *FreeCycle* appliqué aux conditions de l'expérience *témoin*.

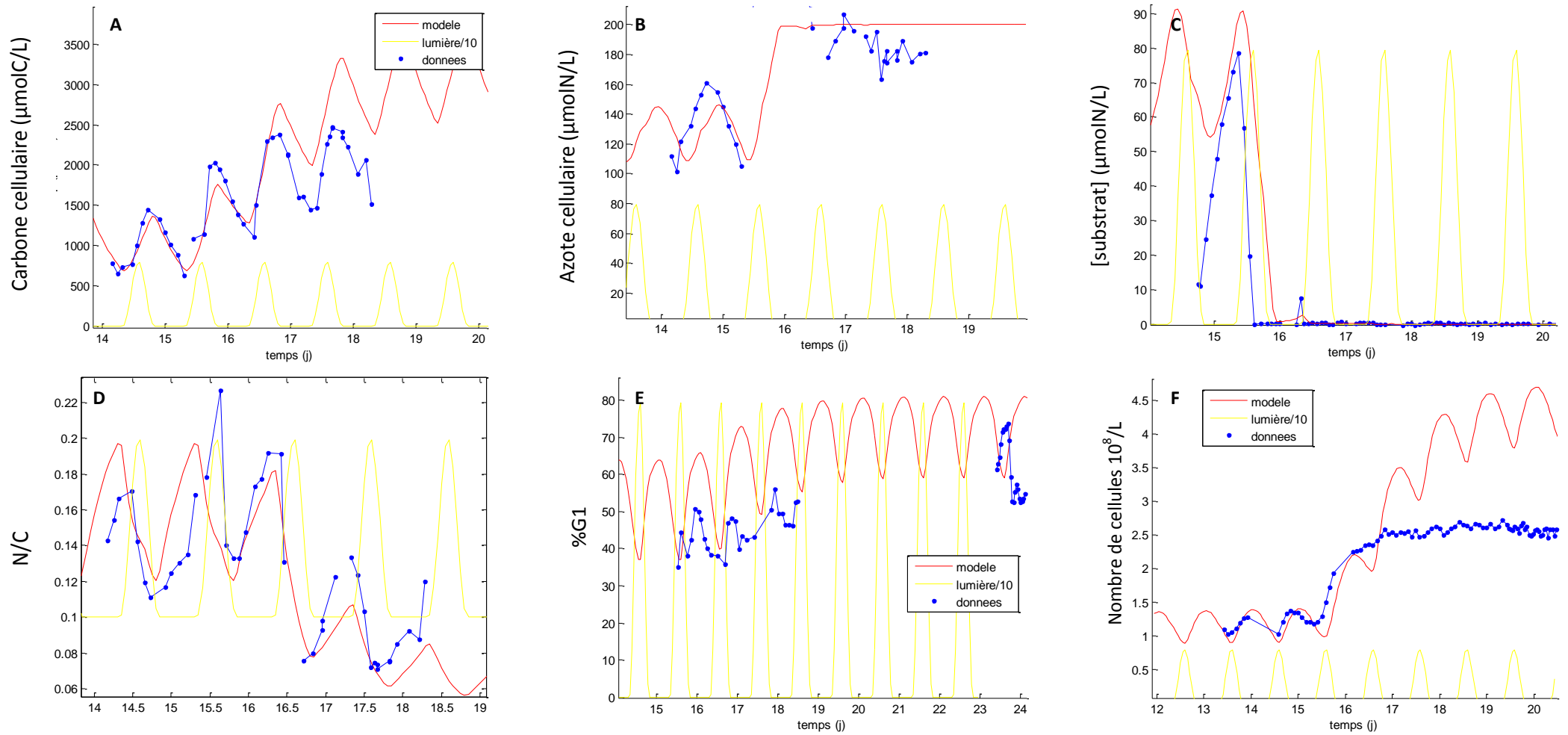


Figure 90. Résultats du modèle *FreeCycle* appliqué aux conditions de l'expérience *Nlim*.

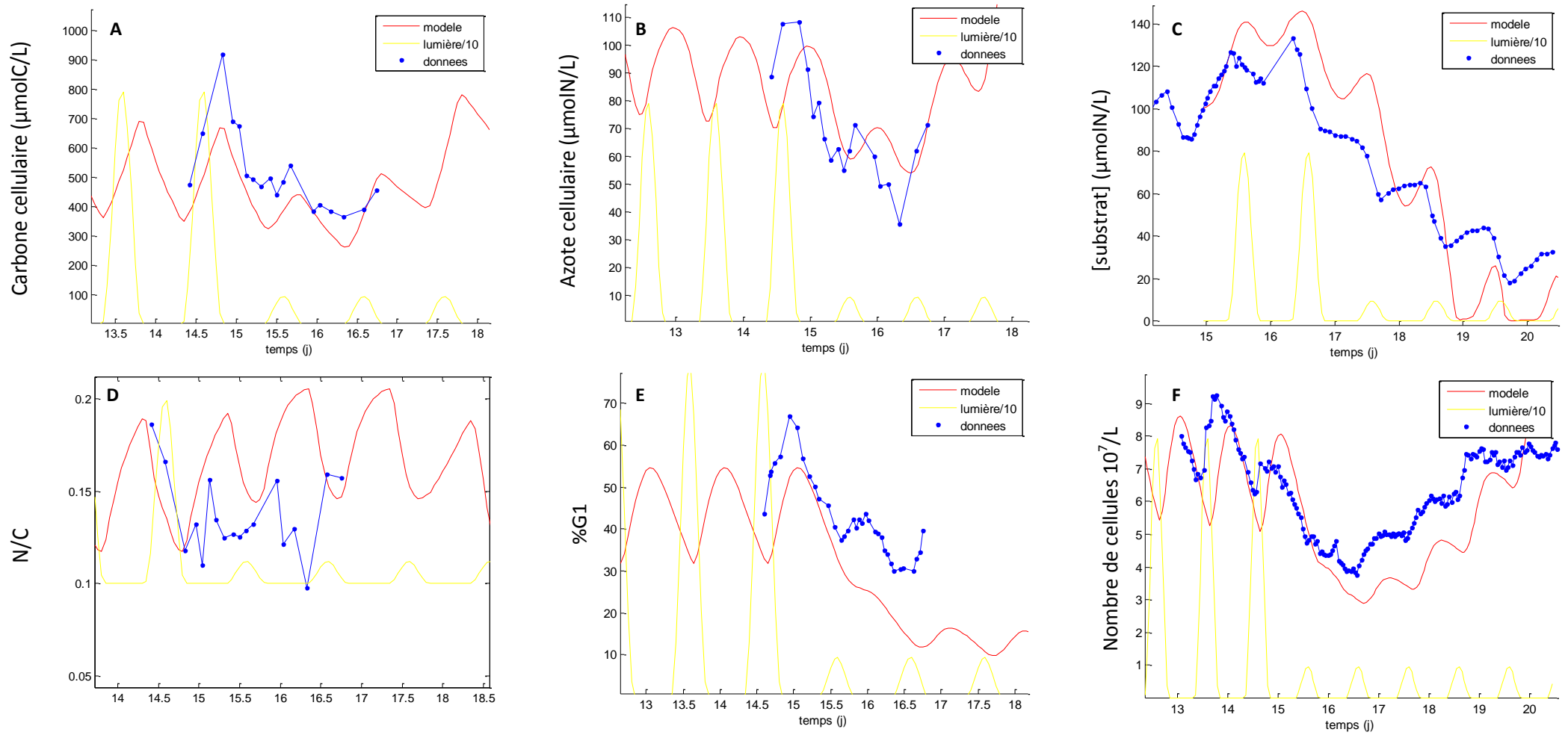


Figure 91. Résultats du modèle *FreeCycle* appliqué aux conditions de l'expérience *Llim*.

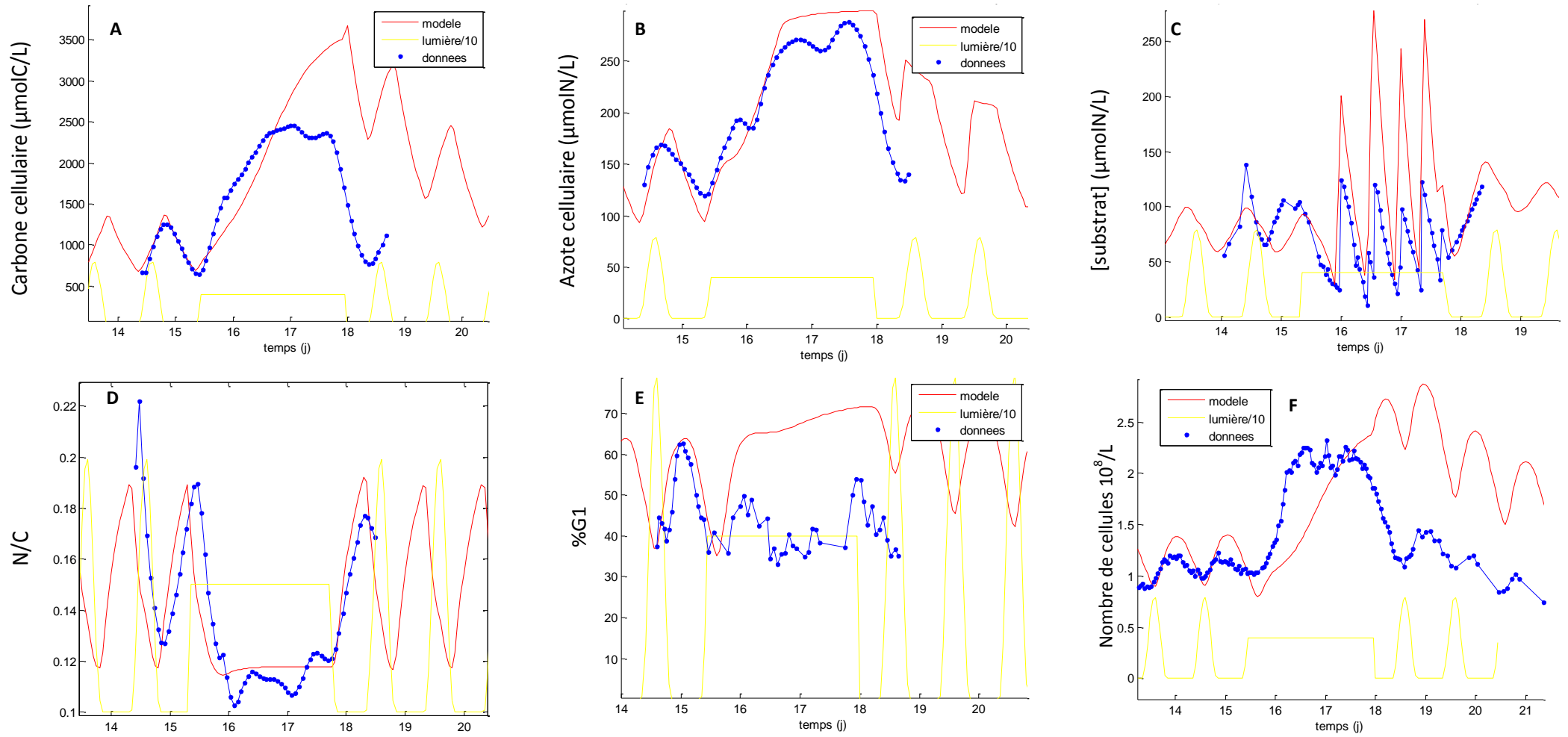


Figure 92. Résultats du modèle *FreeCycle* appliqué aux conditions de l'expérience CL.

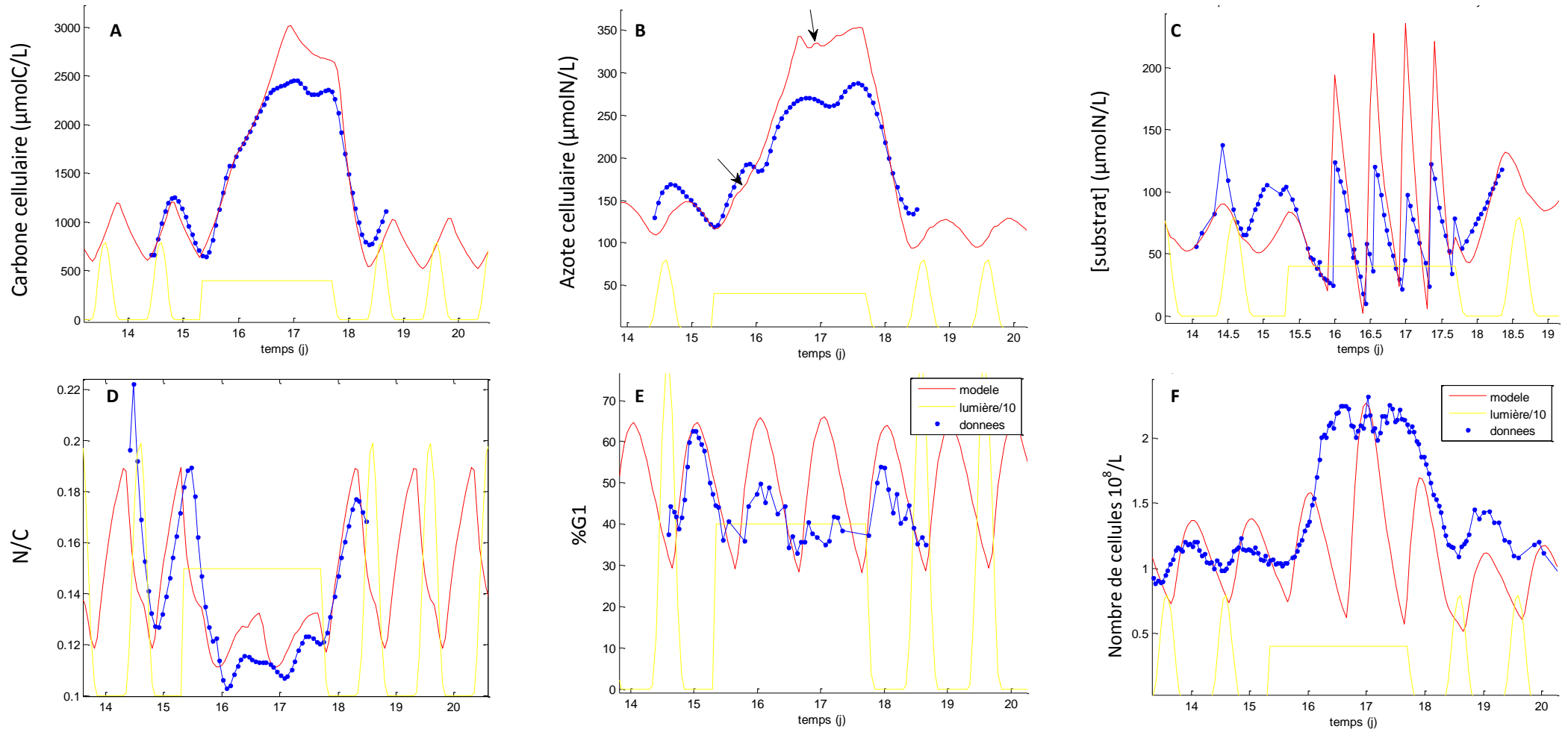


Figure 93. Résultats du modèle *GatedCycle* appliqué aux conditions de l'expérience CL.

4. Conceptualiser l'hypothèse de la restriction temporelle de la division (*gating*)

4.1. Description du modèle

Le schéma précédent ne permet pas de représenter les oscillations du taux d'acquisition d'azote au-delà de 12h d'illumination continue. Plusieurs tentatives ont été réalisées dans le but de conserver la dynamique du cycle cellulaire en lumière continue, par exemple en déplaçant ou augmentant l'intervalle sur lequel la dose de lumière est calculée. Cependant, ces tentatives se sont révélées infructueuses. Dans le schéma que nous proposons maintenant, nous insérons une composante indépendante du signal lumineux apte à maintenir une synchronisation de la population en lumière continue. Reprenant la vision du « *gating* » de Hellweger 2008, nous supposons que la division ne peut avoir lieu qu'au sein de certains intervalles de temps quotidiens fixée par une horloge interne. Dans le chapitre IV, nous notons l'existence de deux intervalles quotidiens pendant lesquels la division est dopée : en fin de nuit (aube) et en fin de jour (crépuscule).

Le modèle *GatedCycle* est donc conçu pour représenter le phénomène de « *gating* » (Schéma 3). Seul l'intervalle du crépuscule est représenté car nos résultats (Chapitre IV) l'identifient comme ayant le plus d'influence sur l'acquisition d'azote. Souhaitant représenter un passage ponctuel et massif dans l'état M chaque jour, nous appliquons cette

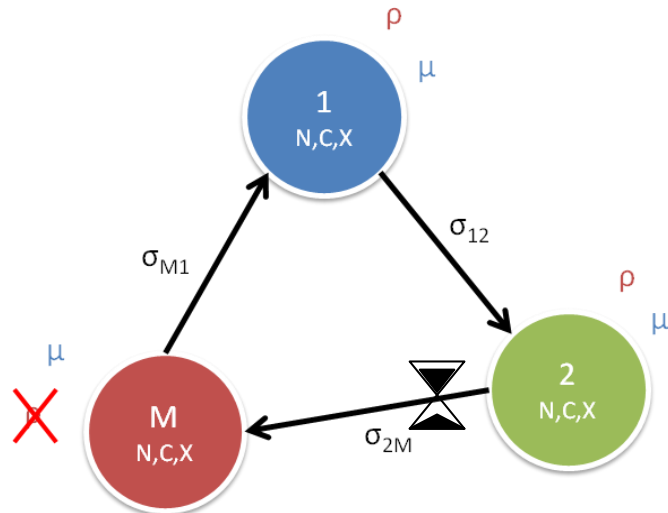


Schéma 3. Modèle *GatedCycle*. Identique au schéma de *FreeCycle* sauf restriction horaire du passage entre 2 et M.

restriction temporelle sur le taux de passage entre les états 2 et M (Schéma 3). Les équations du modèle sont similaires à celles de *FreeCycle* à la différence que le passage entre G2 et M n'est autorisé qu'en fin de journée (Équations 9).

$$\sigma_{2M} = \sigma_{2Mm} \frac{\bar{I}^4}{\bar{I}^4 + k_{Ld}^4} \quad \text{entre 15h et minuit}$$

$$\sigma_{2M} = 0 \quad \text{entre minuit et 15h}$$

Équations 9. Modification du taux de passage entre les états 2 et M dans le modèle *GatedCycle*

4.2. Résultats et comparaison aux données de l'expérience CL

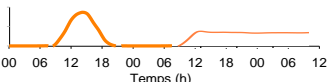
Les modèles *FreeCycle* et *GatedCycle* ont des sorties comparables quand ils sont simulés dans les conditions précédemment testées, sauf sous illumination continue. Dans cette condition, la prise en compte d'une horloge interne permet de simuler un cycle cellulaire dynamique au niveau de la population, en partie en phase avec les données (Figure 93E, p168). La variation diurne du nombre de cellules est surestimée mais reste en phase avec les observations (Figure 93F). Tout au long de la phase de lumière continue, les oscillations simulées du pM permettent de représenter des variations diurnes de l'azote cellulaire. Un premier épaulement est visible au bout de 12h sous illumination continue, correspondant au crépuscule subjectif. Une diminution de l'azote cellulaire est également simulée 24h plus tard et à la fin de la période de lumière continue (Figure 93B).

5. Validation sur d'autres jeux de données

5.1. Passage en lumière continue après acclimatation en cycle diurne d'une population limitée par l'azote

5.1.1. L'expérience

Les modèles précédents sont testés lors d'une modification du signal de lumière, à savoir le passage d'un cycle diurne à une illumination continue. Les données sont issues des expériences de L. Pawlowski (2004) conduites à 17°C (-5° par rapport à nos expériences) sur des populations limitées en azote de *Thalassiosira weissflogii*. Vu que le dispositif de régulation du pH est une innovation contemporaine à nos expériences, l'absence de limitation par le carbone n'a pas pu être vérifiée.

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
CL2	Max en LD = 180 Dose en LD = 4 Dose en CL = 8 	D= 0,4/j Mode chemostat Sin=70 $\mu\text{mol}/\text{L}$

5.1.2. Les résultats de nos modèles

Le carbone, l'azote et le ratio N/C sont bien reproduits par l'ensemble des modèles (Figure 94A à D), mais à condition de baisser de moitié le paramètre établissant le taux de fixation de carbone maximum (= taux de croissance maximum). Les raisons invocables sont la température plus faible et une possible limitation en carbone. Dans le cas présent, la seconde possibilité apparaît peu crédible puisque l'azote est lui-même un élément nutritionnel limitant.

FreeCycle et *GatedCycle* prévoient une augmentation du pG1 lors du passage en lumière continue (Figure 94E), suggérant un renforcement de la limitation en azote ; mais n'ayant pas suivi la dynamique du cycle cellulaire, nous ne pouvons confirmer cette tendance. Dans cette expérience, comme dans notre expérience *Nlim*, l'effet du cycle cellulaire sur le carbone et l'azote n'est pas visible puisque tous les modèles ont exactement les mêmes sorties tout au long des 24h d'un jour (Figure 94A à D). Nous supposons que l'augmentation du pG1 moyen atténue la proportion relative de cellules en phase M, et réduit donc l'impact des pics de mitose.

Notons que si la représentation du cycle cellulaire ne conduit pas à une meilleure simulation des flux de matière, elle permet cependant de simuler assez correctement la densité cellulaire. L'augmentation observée sous illumination continue est reproduite mais le niveau atteint est surestimé (Figure 94F), signe d'un découplage entre la croissance somatique et la division cellulaire (Falkowski & Stone 1975). Sous éclairage diurne, les oscillations prédites par les modèles ne sont pas en phase avec les données (division en fin de nuit) mais lors du passage en lumière continue, elles se retrouvent en phase (division en fin de journée). Cette constatation renforce l'hypothèse des deux intervalles de division (Cf. p113), nous supposons donc que la prise en compte d'une seconde « ouverture de porte » dans *GatedCycle* pourrait améliorer sa représentativité.

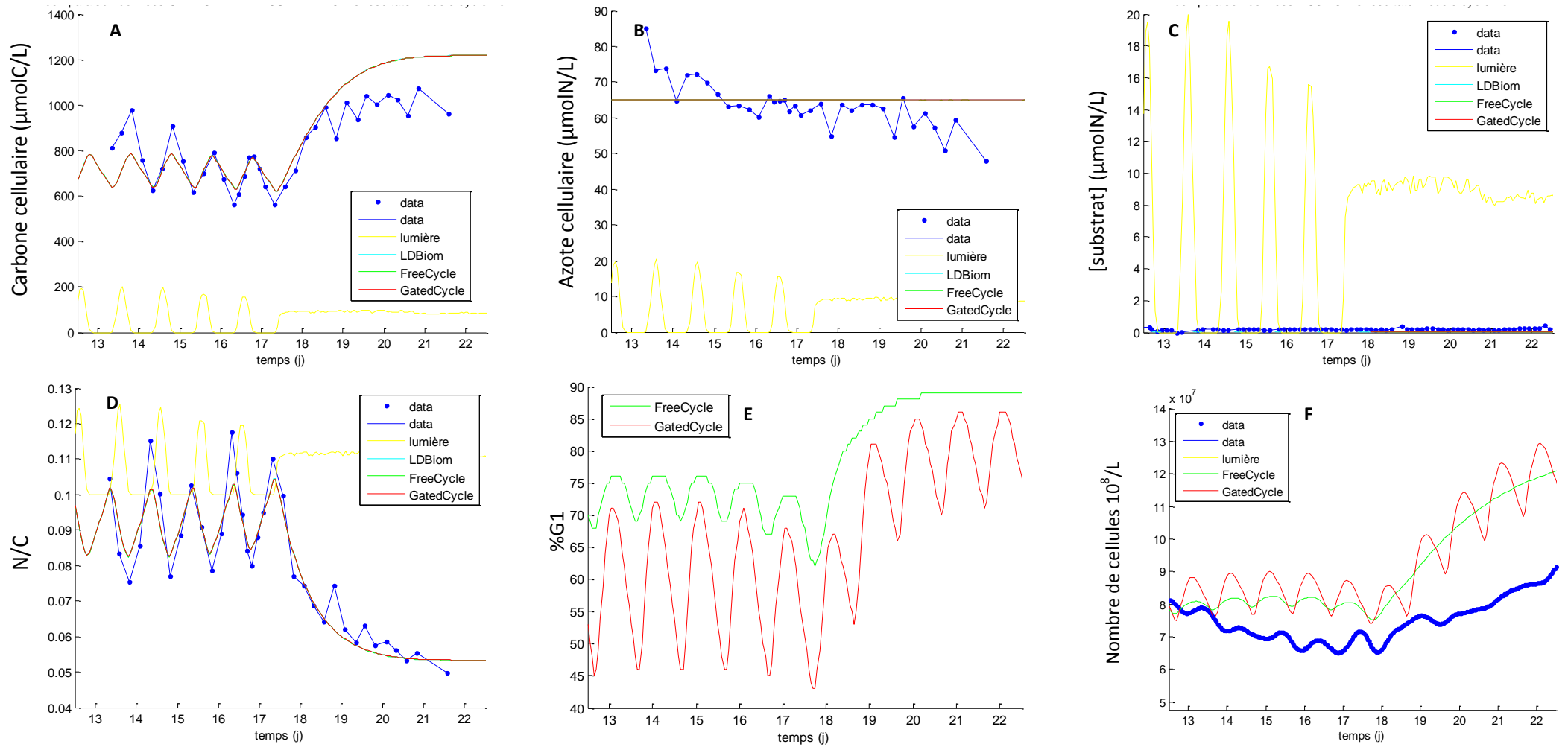


Figure 94. Résultats des différents modèles appliqués aux conditions de l'expérience CL2.

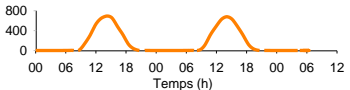
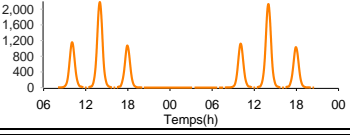
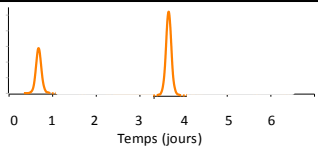
5.2. Simulation de couches de mélange, croissance non limitée par l'azote

5.2.1. Les expériences

Nous testons maintenant nos modèles avec des forçages de type 'couche de mélange' (explication p125). Deux conditions sont testées où les oscillations du signal de lumière ont des périodes de 0,3 ou 3j, correspondant à des fréquences de 0,250 ou 0,013Hz.

Dans le premier cas, les conditions engendrent 3 pics de lumière par jour pendant les 12h d'éclairement possible. Les conditions sont celles de l'expérience *ML*, les cultures sont acclimatées en conditions *pré-ML* (Tableau ci-dessous).

Dans le second cas, la dose de lumière reçue dépend des jours. Les cultures sont fortement éclairée un jour sur trois, et faiblement voir nullement au cours des autres jours. Les données sont issues de l'expérience que nous appellerons *ML2* conduite par L. Pawlowski (2004) sur *Thalassiosira weissflogii*, à 17°C sans régulation du pH (Tableau ci-dessous). Les cultures sont préalablement acclimatées en mode chemostat sous illumination continue.

Conditions	Lumière maximum journalier en $\mu\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{s}$ dose journalière en $\text{molquanta}/\text{m}^2/\text{j}$	Azote D = taux de dilution
Pré-ML	Max = 700 Dose = 15 	D = 1,4/j D $\geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
ML	Max = 2200 Dose = 15 	D = 0,9/j D $\geq \mu$ Sin = 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$
ML2	Signal Variable de période 3j 	D = 0,35/j Mode chemostat Sin = 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$

5.2.2. Simulation d'une variation de lumière à haute fréquence (expérience ML)

Avec ces conditions, les modèles *FreeCycle* et *GatedCycle* ont les mêmes sorties de matière. Tous les modèles retranscrivent assez correctement les variations à haute fréquence du carbone cellulaire (Figure 95A). L'azote particulaire est cependant surestimé par rapport aux mesures (Figure 95B) et les modèles rendent compte difficilement des variations hautes fréquences liées aux fluctuations rapides de l'éclairement.

Dans les modèles *Cycles*, des inflexions sont simulées dans les évolutions d'azote cellulaire et inorganique (flèches Figure B et D), qui ne sont pas représentées par le modèle *LDBiom*. La simulation de ces dépressions est concomitante à celle d'un évènement de mitose (Figure E), suggérant que les oscillations observées sont dues au passage en M d'une partie de la population. Or, nous rappelons que les mesures mettent en évidence l'absence de synchronisation dans la population (Cf. p128), donc les oscillations réellement observées ne peuvent être imputables au cycle cellulaire. Elles semblent davantage reliées aux oscillations de l'éclairement. D'ailleurs, la prise en compte directe de la lumière sur l'acquisition d'azote permet de représenter correctement ses variations horaires (Figure 95G).

Les fluctuations du ratio N/C sont correctement rapportées par les modèles (Figure 95C), sauf que le niveau moyen est surestimé à cause de la surestimation de l'azote cellulaire. Ces simulations soulignent une incohérence dans les données d'azote. En effet, la somme des mesures d'azote cellulaire et inorganique (environ 120µmol/L) est largement inférieure à la concentration en azote du milieu de renouvellement (190µmol/L). L'écart observé peut être dû à des erreurs de mesures ou à l'excrétion d'une partie de l'azote absorbé sous une forme non mesurée par nos instruments. Le modèle ne rend évidemment pas compte de la perte d'azote mesurée et continue de simuler un transfert total de l'azote du milieu de renouvellement vers les compartiments cellulaire et inorganique. Ici, nos modèles prédisent donc l'évolution du système si celui-ci n'avait pas subi de perte d'azote.

Nous noterons que la désynchronisation de la population n'est pas représentée par nos modèles car la dynamique du cycle cellulaire est simulée à partir de l'évolution de la dose de lumière, qui continue de varier sur une période de 24h. L'intégration de l'effet de la lumière à court terme sur la dynamique du cycle pourrait permettre de simuler une synchronisation variable en fonction du signal de lumière.

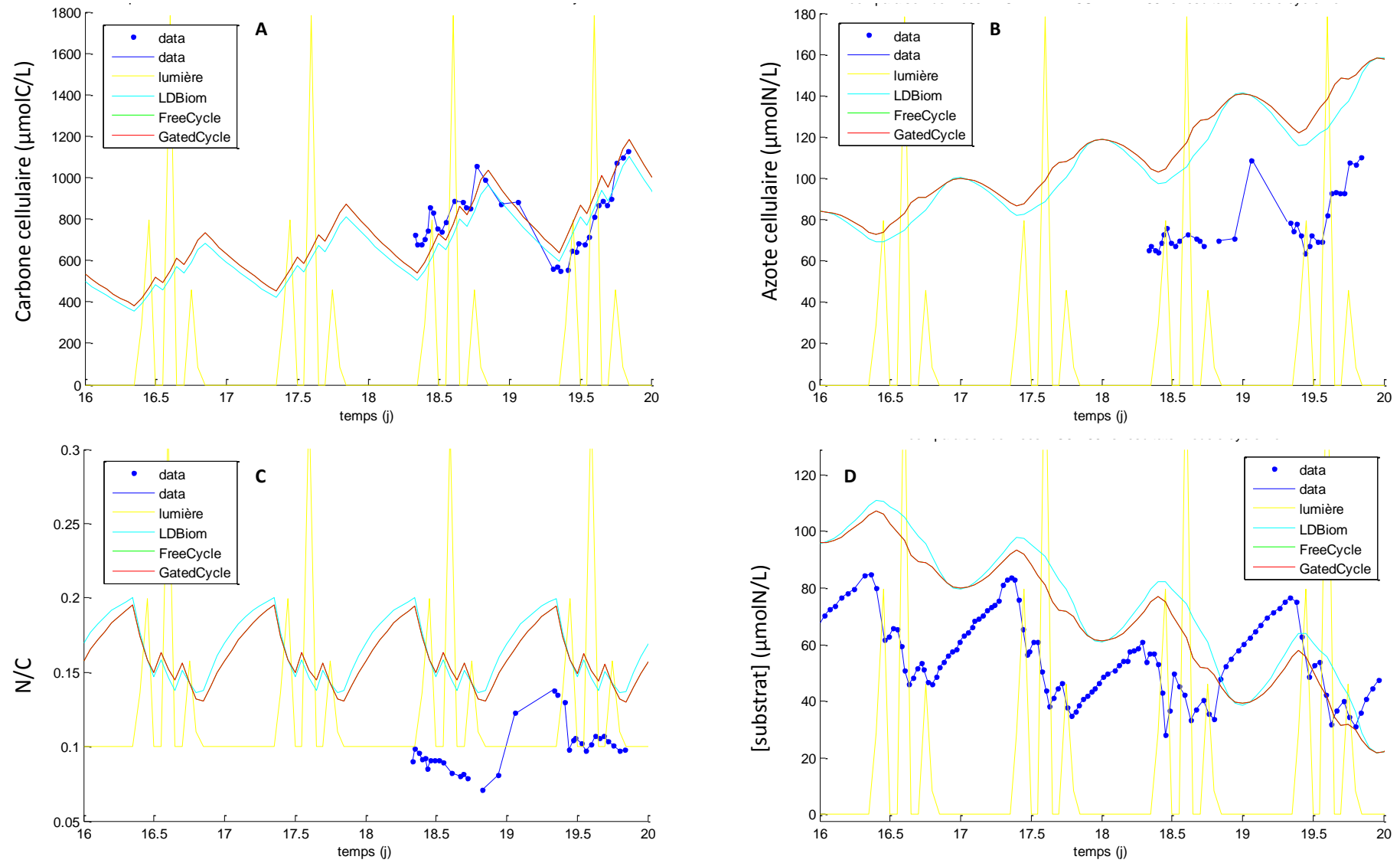


Figure 95. Résultats des différents modèles appliqués aux conditions de l'expérience *ML*

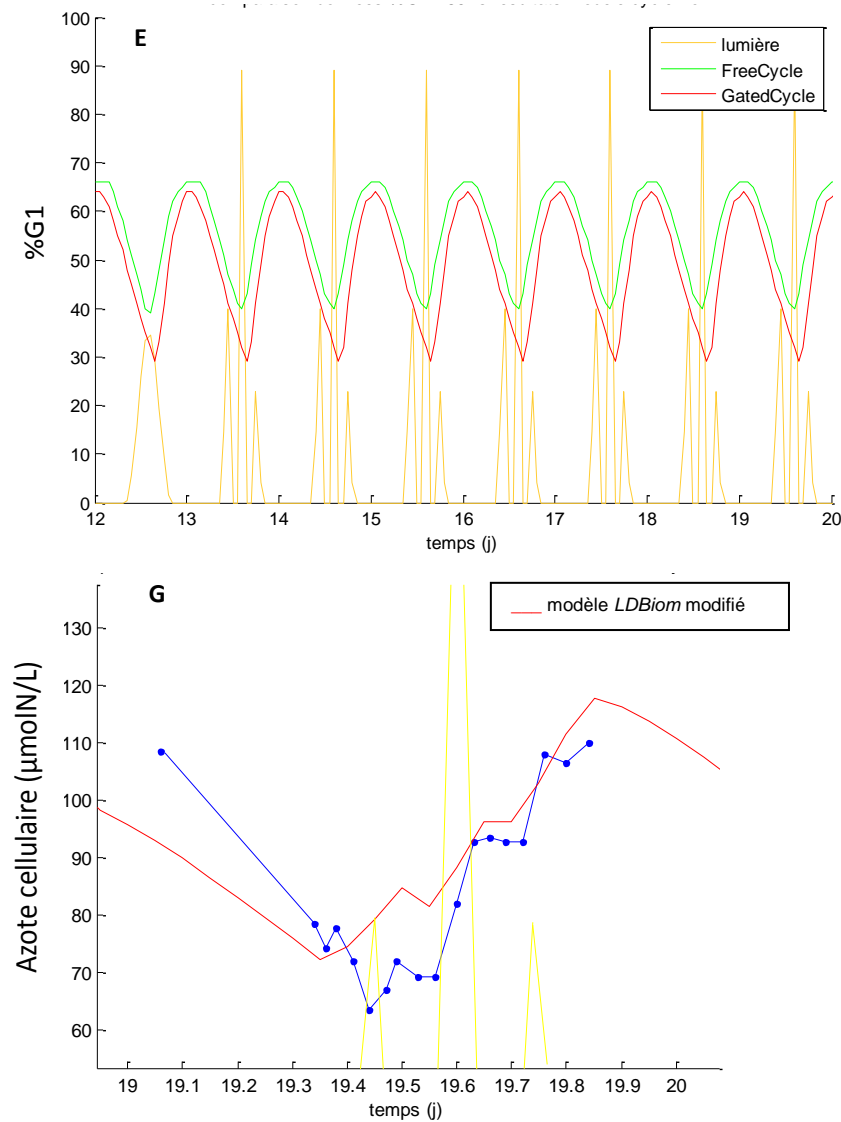


Figure 95 suite

(Résultats des différents modèles appliqués aux conditions de l'expérience ML)

notes :

F : la variation du nombre de cellules observée au jour 19 est due au prélèvement d'un volume de culture important pris en compte dans le modèle

G : la courbe rouge représente la simulation de l'azote cellulaire par un modèle LDBiom modifié prenant en compte directement l'impact de la lumière sur l'acquisition d'azote selon la formule:

$$\rho = \rho_{\max} \frac{S}{S + k_s} \left(1 - \frac{Q}{Q_{\max}} \right) \left(\frac{L}{L + k_L} \right)$$

5.2.3. Simulation d'une variation de lumière à basse fréquence (expérience ML2, données Pawlowski 2004)

Comme dans la simulation de l'expérience CL2, le paramètre fixant le taux de croissance maximum a dû être diminué de moitié par rapport aux conditions de l'expérience *témoin* afin de représenter la différence de température, les autres paramètres sont conservés. Avec cette modification, tous les modèles retranscrivent plutôt correctement les variations observées du contenu en carbone, particulièrement les pics mineurs causés par les événements de faible et bref éclaircissement (Figure 96A).

De même, les oscillations de l'azote (cellulaire et inorganique) sont plutôt correctement représentées en phase et amplitude (Figure 96B et D). La plus grande différence entre les modèles de cycle et le modèle *LDBiom* a lieu après chaque pic de lumière. Dans les modèles *Cycle*, chaque épisode lumineux engendre le déblocage des cellules en phase G2, et donc leur passage en mitose (Figure 96E, l'augmentation du pG1 localise la phase de mitose). La simulation des événements de mitose engendre une réduction temporairement de l'acquisition d'azote de la population en fin de journée (Figure 96G). La reprise de l'acquisition d'azote, observée dans les expériences en début de nuit, est représentée (flèches) mais son intensité est sous-estimée (les pics observés dans les données ne sont représentés que par des épaulements).

Au final, la majeure partie des oscillations du ratio N/C observées dans les données est représentée par les trois modèles (Figure 96C). L'effet particulier des événements de mitose y est reporté, comme en atteste l'écart entre les modèles *Cycles* et *LDBiom* après un épisode de fort éclaircissement.

Contrairement au modèle *GatedCycle*, le modèle *FreeCycle* ne simule pas de dynamique du cycle cellulaire en obscurité continue. Celui-ci n'ayant pas été suivi au cours de cette expérience, il n'est pas possible de valider directement cet aspect du modèle. Cependant, la cohérence entre la simulation et la mesure de la densité cellulaire, notamment au niveau de la phase, est un élément de validation indirecte (Figure 96F).

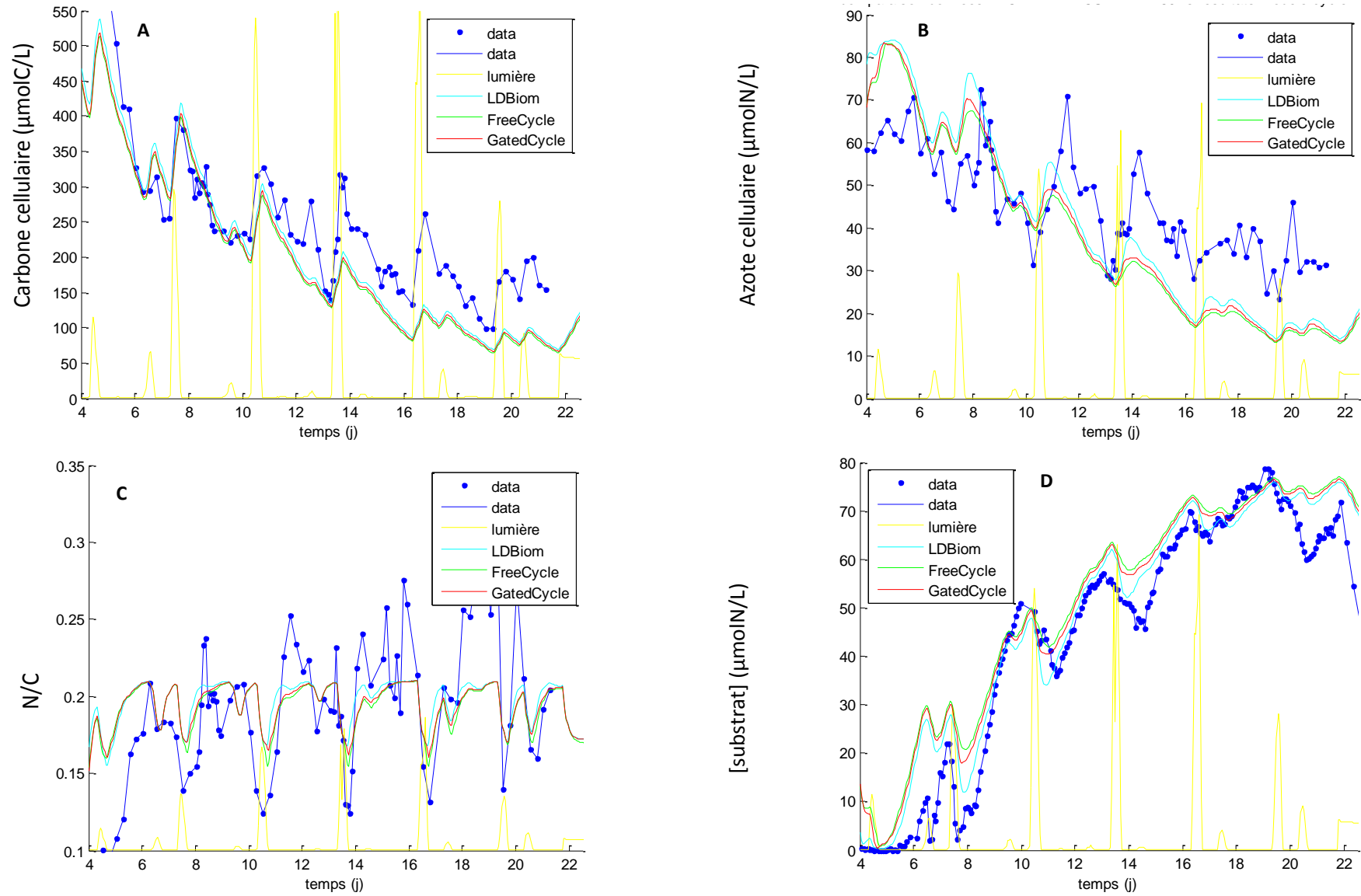


Figure 96. Résultats des différents modèles appliqués aux conditions de l'expérience *ML2*

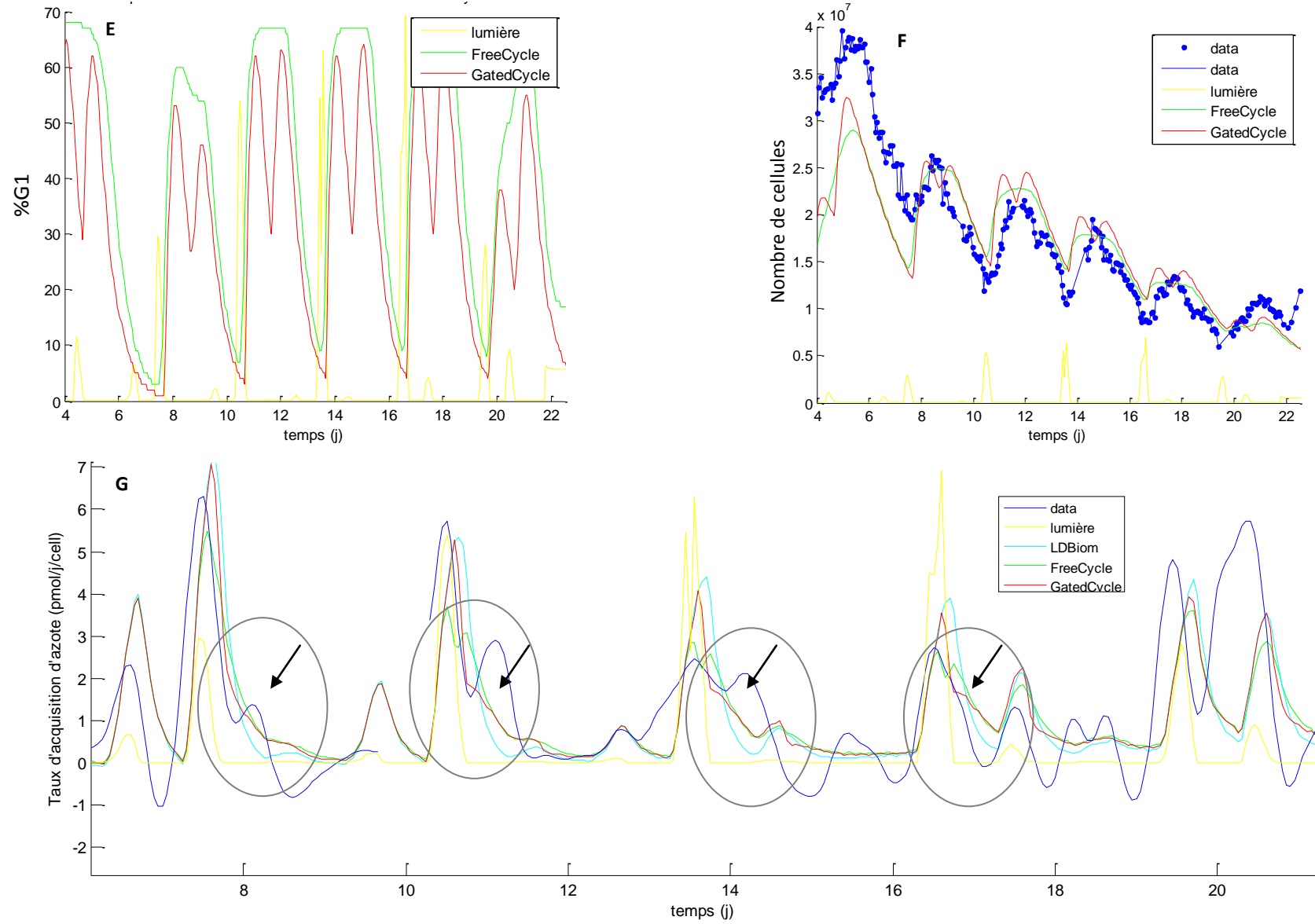


Figure 96 suite (Résultats des différents modèles appliqués aux conditions de l'expérience ML2)

6. Intérêts de la prise en compte du cycle cellulaire

Le modèle *LDBiom* s'avère capable de représenter la majeure partie du métabolisme de croissance de *Thalassiosira weissflogii* à l'échelle horaire. Il présente toutefois certaines lacunes que la prise en compte du cycle cellulaire permet de combler. L'une d'entre elle est le décalage de la phase d'acquisition d'azote de quelques heures simulé dans *LDBiom* par rapport aux données. Ce décalage est dû au retard entre 1/ l'effet direct de la lumière sur la prise de carbone et de 2/ l'effet du contenu en carbone sur la prise d'azote. La simulation d'un évènement de mitose en fin de journée permet de recalibrer les variations d'azote en phase avec les données. Une autre lacune du modèle *LDBiom* est l'arrêt de toute oscillation dès lors que l'éclairement devient continu, la prise en compte du cycle cellulaire permet de conserver temporairement (*FreeCycle*) ou sur le long terme (*GatedCycle*) une cinétique d'acquisition d'azote dynamique sous illumination continue. En plus d'améliorer la représentation de la croissance somatique diurne, la prévision de la dynamique du cycle cellulaire, à l'équilibre et lors des changements de conditions de croissance, peut être considérée comme un avantage en soi. Enfin, représenter le cycle cellulaire permet de simuler l'évolution horaire du nombre de cellules et ainsi d'approcher leur contenu en carbone et azote.

Cependant, ces améliorations ont un prix : la complexification du schéma conceptuel. Les modèles *Cycles* ont approximativement une fois et demi plus de paramètres et plus de 2 fois plus de variables que le modèle *LDBiom* (Tableau 14). Dans notre cas, le choix de la plupart de ces paramètres a un sens car il résulte des données obtenues lors de notre série d'expériences. Cependant, les interactions dans les modèles *Cycles* deviennent plus difficiles à appréhender, ce qui complique leur paramétrisation et leur analyse.

Tableau 14. Complexité comparée des modèles *LDBiom*, *FreeCycle* et *GatedCycle*.

	<i>LDBiom</i>	<i>FreeCycle</i>	<i>GatedCycle</i>
nombre de paramètres	7	10	11
nombre de variables	3	7	7

En conclusion, le type de modèle à utiliser doit être choisi en relation avec ce que l'on cherche à représenter ou tester. Si la question est de représenter l'évolution diurne globale de l'azote et du carbone, la prise en compte du cycle cellulaire ne semble pas nécessaire, particulièrement dans un environnement limité en azote.

Cependant, la volonté de représenter plus finement la prise d'azote au niveau horaire, par exemple pour comprendre ses mécanismes de régulation, conduira à prendre en compte le cycle cellulaire. Par exemple, ce niveau de précision nous a permis d'accréditer ou non la responsabilité du passage en mitose dans les différentes oscillations observées de l'acquisition d'azote. D'une manière plus ou moins analogue, Bruyant *et al.* (2005) ont suggéré l'effet de la division sur la capacité photosynthétique en observant un écart entre sorties de modèle et données au moment de la division. La prise en compte du cycle cellulaire en modélisation paraît donc avantageuse pour tester des hypothèses l'impliquant.

Ici, nous constatons que le contrôle de la lumière sur le cycle cellulaire est mieux représenté quand le passage entre G2 et M est fonction d'un seuil, et non d'une fonction de Michaelis-Menten. Nous pouvons donc supposer que la lumière agit sur le cycle sous la forme d'un point de restriction que la cellule ne franchit qu'après avoir été exposée à une dose de lumière suffisante. Notons que nos résultats expérimentaux suggèrent également l'effet de la lumière sous la forme d'un seuil plutôt que d'un lien proportionnel (Figure 56 p115).

Ensuite, l'impossibilité de conserver une synchronisation du cycle cellulaire sous illumination continue sans prendre en compte d'horloge interne accrédite l'hypothèse du *gating* suggérée dans le Chapitre VI.

En outre, la représentation du cycle cellulaire dans un modèle de flux permet de simuler parallèlement la variation des flux de matière et celle du nombre de cellules, ce qui permet de simuler les quotas cellulaires en carbone et azote. Cette représentation souligne le découplage entre croissance somatique (acquisition de matière) et division cellulaire quand la croissance est limitée par l'azote (Falkowski & Raven 1997).

Enfin, ce genre de modèle pourrait être utile pour tester l'effet des conditions de croissance sur le déroulement du cycle cellulaire. En biotechnologies cela pourrait, par exemple, aider à trouver les conditions de croissance optimales à la production d'une substance d'intérêt, si celle-ci dépend de la phase du cycle.

7. Quelques améliorations utiles envisageables

Une lacune de nos modèles *Cycles* est de ne pas simuler de façon convaincante la désynchronisation observée de la population lorsque les conditions s'éloignent d'un optimum. Examinons quelles modifications pourraient combler cette lacune.

Revenons dans un premier temps sur la particularité du modèle *GatedCycle*. La restriction temporelle de la division permet de mieux localiser les phases de mitose et donc de mieux représenter leur effet sur l'acquisition d'azote. Il peut paraître arbitraire que ce soit au modélisateur de fixer l'heure du passage en mitose, mais cela correspond à des observations biologiques (Cf. Chapitre IV). Cependant, celles-ci nous ont permis d'identifier deux fenêtres de divisions quotidiennes, et nous en avons représenté qu'une seule dans le modèle. Nous supposons que la prise en compte de la seconde fenêtre est susceptible de représenter la désynchronisation de la population observées lors d'un passage en conditions défavorables à la croissance. En effet, elle favoriserait la répartition des événements de divisions sur plusieurs intervalles quotidiens.

Toutefois, puisque le phénomène de synchronisation est le reflet de la variabilité inter-individuelle, il sera sans doute difficile à représenter dans un modèle de flux. Au contraire, la vision individu-centré permettrait d'introduction de la stochasticité entre les cellules. Nous pensons par exemple à rendre variables les coefficients de demi-saturation sur la lumière ou sur l'azote (k_s , k_L , k_{Ld}). Chaque cellule pourrait ou non continuer à acquérir de la matière et/ou à avancer dans son cycle en fonction des conditions *et* de ses caractéristiques propres. Cela engendrerait une désynchronisation partielle de la population quand les conditions d'azote et/ou de lumière s'éloignent de celle de l'expérience *témoin*. Un exemple de ce type de modélisation est illustré dans les figures ci-dessous. Nous avons choisi de simuler l'évolution du contenu cellulaire en carbone d'une dizaine de cellules sous cycle lumineux diurne. La cellule se divise quand le contenu en carbone atteint sa valeur maximum (100). Pour représenter la variabilité interindividuelle, le k_L de chaque cellule est tiré aléatoirement entre 10 et 12 (Figure 97). Les simulations montrent que sous lumière saturante ($L_{\max} = 100 \gg k_L$), la population est fortement synchronisée (Figure 97A). Sous faible éclaircissement ($L_{\max} = 10 \approx k_L$), la variabilité individuelle apparaît, les divisions n'interviennent plus en même temps (Figure 97B), la population se désynchronise.

$$\begin{aligned} \dot{Q} &= Q_{\max} \frac{L}{L + k_L} \\ \dot{C} &= QC \end{aligned}$$

Équations 10. Equations du modèle IBM discuté p182.

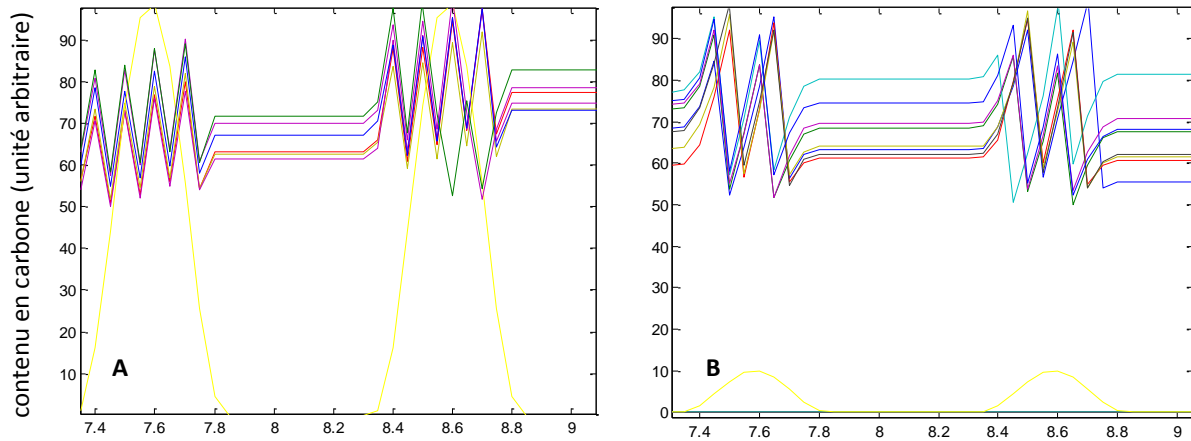


Figure 97. Simulation du contenu en carbone selon un modèle IBM dans lequel de la stochasticité a été introduite sur le k_L (Cf. équation ci-dessus). Chaque courbe correspond au comportement d'une cellule. La courbe jaune représente le flux de photons. A. Quand $L_{\max} \gg k_L$, la population est synchronisée. B. Quand ($L_{\max} \approx k_L$), la variabilité individuelle apparaît et désynchronise la population.

Nous pensons que la logique individu-centrée peut être à même de représenter la conservation de la dynamique du cycle cellulaire sous illumination continue, sans introduire de paramètre arbitraire comme c'est le cas dans le modèle *GatedCycle*. En effet, nous pourrions calculer la dose cumulée de lumière reçue individuellement par chaque cellule, au lieu d'une moyenne calculée sur le temps de génération moyen de la population. Nous supposons que cette dose cumulée serait en constante évolution, même sous lumière continue. Ainsi, elle permettrait de conserver une dynamique dans le cycle cellulaire sans avoir à conceptualiser le phénomène du *gating*. L'idée biologique sous jacente est que la division cellulaire est dépendante de la taille, autrement dit des produits photosynthétiques créés (Wells 2002).

Nous pensons donc que la volonté de mieux représenter l'effet du cycle cellulaire sur la croissance somatique et la division cellulaire conduira à une vision individu-centrée. Nous noterons toutefois que nos modèles de flux « *Cycles* » représentent déjà une grande partie de la variabilité de ces processus.

Chapitre VIII

Discussion générale



Death of the idea, by rithwick

VIII. Discussion et Perspectives

1. A quoi correspond réellement le signal de mitose ?

Notre méthode de marquage ne permettant pas de dissocier les phases G2 et M, il nous a fallu utiliser une autre méthode pour localiser la phase mitotique. Le taux de division permet déjà d'approcher cette phase. Cependant nous avons préféré utiliser l'information issue du suivi du cycle cellulaire. Plusieurs raisons expliquent ce choix, malgré une manipulation plus lourde (analyse manuelle, utilisation du cytomètre en flux et de produits chimiques). D'un point de vue théorique, le suivi du signal de mitose est avantageux, car son calcul provient de mesures directes de cycle cellulaire, et non de sa conséquence sur le taux de division. D'un point de vue pratique, les variations relatives du signal de mitose sont conservées lors d'un changement des conditions de croissance, contrairement au taux de division dont la moyenne journalière sera affectée en cas de limitation (Figure 36 p86, Figure 41 p91, Figure 44 p93, Figure 45 p95). Enfin, les mesures de cycle sont moins bruitées que celles du dénombrement, offrant une meilleure confiance dans l'analyse de son signal dérivé.

Revenons maintenant sur la légitimité théorique du signal de mitose. De prime abord, nos résultats montrent que, lorsque la part des cellules en G1 (pG1) commence à augmenter, l'acquisition d'azote est faible au niveau de la population. Ensuite, nous observons que le pic du signal dérivé du pG1 est toujours décalé, voir opposé au pic journalier d'acquisition d'azote. Nous pensons que ce pic rend compte du début d'un passage massif de la population de G2/M à G1. Or, la phase de mitose est brève comparée à la durée total du cycle cellulaire, par exemple de l'ordre de 20 minutes chez *Eudorina elegans* (Rayns & Godward 65). Et puisqu'elle termine la phase G2/M, nous faisons l'hypothèse que le signal de mitose permet de la localiser dans le temps.

Examinons maintenant de façon plus détaillée quels processus cellulaires sont visés par ce signal. Pour commencer, détaillons le déroulement de la mitose chez les diatomées. En prophase, le noyau migre sur le côté de la cellule, à mi chemin des deux thèques (Round *et al.* 1990). Le fuseau mitotique (*spindle*, une sorte de rail) est formé en direction des extrémités de la cellule. Puis la membrane nucléaire disparaît et les chromosomes s'attachent au fuseau,

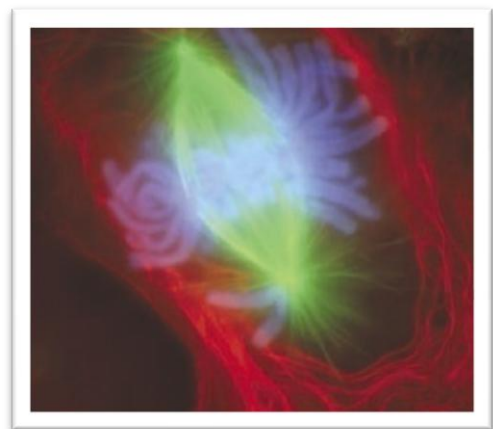


Image 3. Cellule eucaryote (animale) en mitose (métaphase). Les chromosomes sont en bleu et le fuseau mitotique en vert. (Photo du NIGMS, libre de droit)

c'est la métaphase (Image 3). Chaque jeu de chromosome migre ensuite vers une extrémité de la cellule, c'est l'anaphase. Enfin, lors de la télophase le fuseau se désassemble et la membrane nucléaire se reconstitue pour former les deux nouveaux noyaux. Parallèlement au processus de division nucléaire, un sillon de clivage apparaît au milieu de la cellule pour diviser son cytoplasme en deux. Cette opération est de courte durée, de l'ordre de 5 à 20 minutes (Round *et al.* 1990, Pickett-Heaps 1991). Mais, chez les organismes siliceux, chaque cellule fille doit également synthétiser une demi-valve pour compléter son frustule. Or, la séparation du cytoplasme peut être temporellement découplée de l'achèvement du frustule, et donc de la cytokinèse réelle, c.à.d. de la séparation physique des deux cellules filles (Round *et al.* 1990). Il faut donc, dans le cadre de notre travail, préciser la désignation du terme 'mitose'. Théoriquement, après la séparation du cytoplasme de la cellule mère en deux parties, la formation des deux nouveaux noyaux marque celle des deux cellules filles. Prises séparément, ces deux cellules contiennent un seul jeu d'ADN et sont donc en G1 (Figure 1998). Or, nous supposons que nos instruments (cytomètre en flux, HIAC et Coulter) ne dissocient pas les deux individus, tant que la séparation physique des deux cellules n'est pas réalisée. Cela nous conduirait à identifier cette entité comme une seule cellule en G2/M (Figure 98).

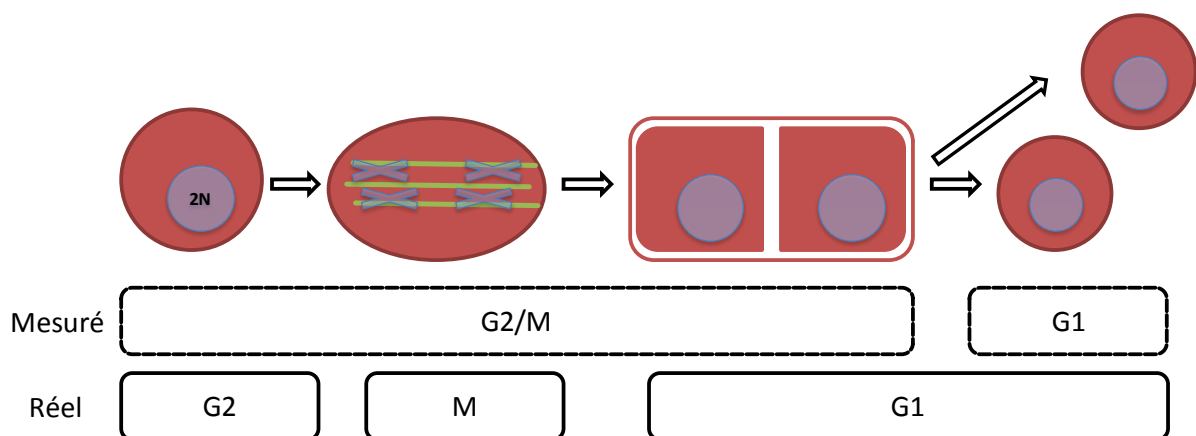


Figure 98. Représentation du découplage entre la mitose et la cytokinèse, et de son impact sur l'analyse réalisée au cytomètre. Nous supposons que nos instruments identifient en G2/M les cellules filles (en G1) jusqu'à leur séparation.

Pratiquement, l'observation au microscope de cellules de la diatomée *Melosira moniliformis* en train de se diviser permet de mettre en évidence une augmentation du protoplasme des cellules filles avant leur séparation physique (Round *et al.* 1990), suggérant un début effectif de la phase G1 avant cette séparation. Avec *Thalassiosira weissflogii*, nos observations confirment que les cellules encore attachées au milieu de la nuit ont déjà reconstitué leur noyau et sont donc déjà en G1 (Image 4). Ceci suggère que ce que nous appelons « mitose » correspond en réalité à des processus post mitotiques, et plus particulièrement à la séparation physique des deux cellules filles.

Cependant, un suivi temporel de ces observations au microscope montre que les cellules sont globalement jointives entre la fin de la journée et le début de la nuit, alors que le signal de mitose est fort. Elles ne se séparent physiquement qu'au cours de la seconde partie de la nuit, quand le signal de mitose est plus faible (Images 5). Contrairement à ce qui a été suggéré au paragraphe précédent, ces observations suggèrent que notre signal de mitose est associé à des événements se produisant avant la séparation physique des cellules. Une hypothèse est que, une fois les noyaux reformés et les protoplasmes séparés, le cytomètre en flux identifie déjà les deux cellules filles indépendantes. Dans ce cas, le signal de mitose localiserait bel et bien les processus mitotiques.

En conclusion, nous ne pouvons pas garantir que les processus impliqués par le 'signal de mitose' sont les processus mitotiques *sensus stricto*, ou s'il s'agit de processus post-mitotiques aboutissant à la séparation des deux cellules filles.

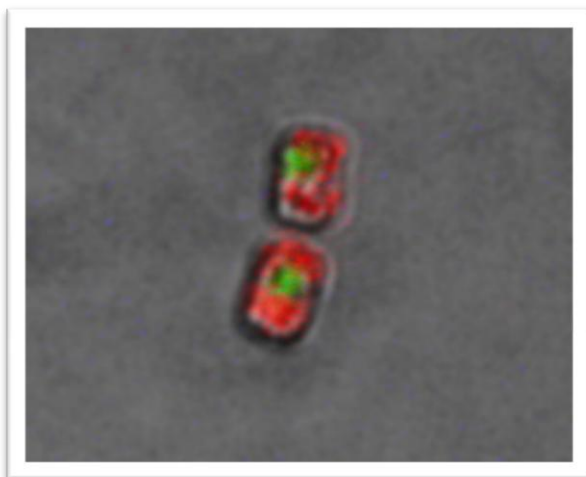


Image 4. Vue de cellules jointives de *Thalassiosira weissflogii* mettant en évidence leurs noyaux. Superposition de vues en lumière naturelle et en épifluorescence. Fluorescence dans le rouge de la Chl a et dans le vert du Sybr-Green-I, marqueur de l'ADN.



Images 5. Vues au microscope optique de cellules de *Thalassiosira weissflogii* issues d'une population exposée en conditions témoin.

2. De l'effet du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote

Dans la littérature, les oscillations diurnes de l'acquisition d'azote des microalgues sont généralement expliquées par la réponse du statut physiologique au flux de photons et à la disponibilité en substrat (Cochlan et al. 1991, Marsot et al. 1992, Vincent 1992, Clark et al. 2002b). Notre étude suggère que le cycle cellulaire interfère également dans la prise d'azote. En effet, nos résultats mettent en évidence, sur des populations synchronisées, une diminution de l'acquisition d'azote lorsqu'une proportion significative des cellules est en mitose¹ (Cf. Chapitres III et VI). Nos observations suggèrent que la cellule n'acquière pas d'azote lors des processus mitotiques, et que les conséquences macroscopiques de cette interruption dépendent du degré de synchronisation de la population (Cf. Chapitre V).

A l'échelle de la population, l'effet individuel du passage en mitose n'a d'impact que si une proportion significative de la population est dans cette phase en même temps. Dans nos expériences, c'est le cas lorsque la population n'est pas limitée par l'azote et qu'elle est soumise à un cycle lumineux diurne (expériences *témoin*, *Llim0*, *Llim1*, *Llim2* et *pré-ML*). Les observations effectuées lors du passage en illumination continue (expérience *CL*) renforcent l'hypothèse d'une interruption de l'acquisition d'azote en mitose. En l'absence de cycle lumineux diurne, la synchronisation de la population est relativement maintenue, et les événements de mitose au sein de la population sont toujours concomitants à une période de faible acquisition d'azote (Cf. p96). Toutefois, l'effet du statut physiologique est toujours visible quand les cellules sont exposées à un cycle lumineux diurne. En effet, l'acquisition d'azote a lieu préférentiellement en période éclairée et, en dehors d'un événement de mitose, elle est liée à l'intensité lumineuse instantanée (Cf. p137). La nuit, sa cinétique est proportionnelle au contenu cellulaire en glucides, et donc à la dose de lumière reçue dans la journée (Cf. p137).

Lorsque la croissance des cellules se déroule de façon asynchrone, seul l'effet des conditions environnementales sur le statut physiologique intervient. C'est le cas lorsque la population est limitée en azote (expériences *Nlim*) et quand la période des oscillations du flux de photon est largement inférieure à 24h (expérience *ML*). Dans le premier cas, l'acquisition d'azote à l'échelle de la population a lieu de jour comme de nuit, et sa cinétique est inversement proportionnelle à l'écart entre le statut azoté de la population et sa valeur maximum (Cf. p141). Dans le second cas, les acquisitions de carbone et d'azote suivent strictement le signal lumineux (Cf. p129).

Notre approche modélisatrice permet de renforcer les hypothèses issues des résultats expérimentaux (Chapitre VII). Notre modèle, représentant l'interruption de la prise d'azote en

¹ Nous retiendrons que les processus impliqués par ce que nous nommons ici 'mitose' restent à confirmer

mitose, permet de tester cette hypothèse sur des jeux de données de la littérature. Il apparaît que cette représentation permet une meilleure restitution de l'acquisition d'azote quand une proportion significative de la population est en mitose.

Maintenant que notre étude a mis évidence que l'acquisition d'azote n'avait pas lieu de façon continue au cours du cycle cellulaire, d'autres approches pourront être envisagées pour approfondir à la fois la cause et l'effet de cette interaction. D'une part, le processus qui accompagne la dépression de prise d'azote n'est pas forcément la mitose *sensu stricto*. Des études impliquant les outils de la biologie cellulaire permettraient d'identifier plus clairement les processus correspondant au 'signal de mitose'. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de croissance spécifiques de certaines phases du cycle cellulaire (Cf. p43) permettrait de préciser l'influence de chacune d'elles sur l'acquisition d'azote. D'autre part, une étude plus détaillée de la chaîne des processus d'acquisition d'azote (absorption, réduction, amination : Cf. p32) permettrait d'identifier lequel (ou lesquels) d'entre eux est (sont) bloqué(s) lorsque le signal de mitose est fort. Par exemple, une accumulation nocturne de nitrates dans la cellule a été mise en évidence (Demanche et al. 1979, Martinez 1991, Marsot et al. 1992, Lomas & Glibert 2000), suggérant un éventuel découplage des processus d'absorption et d'assimilation. Enfin, le séquençage du génome d'un nombre croissant de microalgues permet maintenant de suivre l'expression diurne des gènes impliqués spécifiquement dans l'absorption (Hildebrand & Dahlin 2000) et l'assimilation (Brown et al. 2009, Granum et al. 2009). Ces études permettent d'établir une relation entre la mesure des flux de matière et les mécanismes cellulaires, voir moléculaires, qui les engendrent.

3. La mitose interfère t'elle également avec les processus d'acquisition de carbone ?

Nos expériences suggèrent que la fixation de carbone n'est pas affectée par le processus responsable de la réduction de l'acquisition d'azote, que nous supposons être la mitose. En effet, au cours d'un cycle lumineux diurne, le taux de fixation de carbone est très fortement corrélé au flux de photons. Notamment il n'y a pas d'anomalie quand le signal de mitose est positif (Cf. p139). De plus, les maxima journaliers de fixation de carbone sont toujours en phase avec le midi solaire (Cf. p84 à 92 et p129). Les seules variations de la fixation de carbone non imputables au flux de photons sont visibles sous illumination continue mais elles sont d'une amplitude nettement moindre que celles observées pour l'azote (Cf. p96). Ces oscillations sont également représentées par nos modèles alors qu'ils ne représentent un effet de la mitose que sur l'acquisition d'azote, suggérant que les variations de fixation de carbone observées sont à relier uniquement au ratio N/C (Cf. p168). Enfin, dans ces

conditions temporaires d'illumination continue, les oscillations du contenu cellulaire en Chl *a* (riche en azote) sont conservées en phase et en amplitude alors que le quota en glucides (riche en carbone) est constant (Cf. p130).

La question sous jacente est de savoir comment la fixation de carbone pourrait continuer en mitose si les bouleversements survenant dans cette phase sont à l'origine de l'interruption de l'acquisition d'azote. Justement, la division des plastes suit un rythme indépendant de celui de la division nucléaire (Chiang & Sueoka 69, Zachleder *et al.* 1989, Kuroiwa 1991), et de plus, ils se transmettent d'une génération à la suivante (Douce & Joyard 1990). Ces informations expliqueraient pourquoi les processus mitotiques seraient sans effet sur la fixation de carbone.

Une des corollaires est que le rapport N/C pourrait être modifié au moment de la mitose. Cet effet est effectivement simulé par nos modèles simulant le cycle cellulaire (Chapitre VII), mais son intensité est vraisemblablement trop faible pour qu'il puisse être visible dans nos expériences.

4. La synchronisation particulière de *Thalassiosira weissflogii* est elle un avantage évolutif ?

La plupart des microalgues suivent un cycle cellulaire type dont la phase G1 se déroule le jour et où la mitose survient la nuit (Nelson & Brand 1979, Spudich & Sager 1980). La majorité de la matière est donc généralement acquise en G1, d'ailleurs la capacité photosynthétique a été positivement reliée à cette phase chez *Cylindrotheca fusiformis* (Claquin *et al.* 2004). Chez la plupart des espèces de microalgues, la phase G2 a vocation à préparer la cellule à la division, et est de courte durée. Nos résultats vont à l'encontre de cette généralité, puisque dans la plupart des conditions testées, la phase G1 de *Thalassiosira weissflogii* a lieu la nuit (Cf. Chapitre IV et Figure 99 ci-dessous). Elle ne peut donc constituer la période principale d'acquisition de matière, particulièrement celle de carbone qui nécessite directement la présence de la lumière (Cf. p29). C'est au cours de la phase G2 que l'acquisition de matière est essentiellement réalisée. Cette organisation atypique chez *Thalassiosira weissflogii* peut s'expliquer par la présence d'un point de blocage en G2, réglé sur le

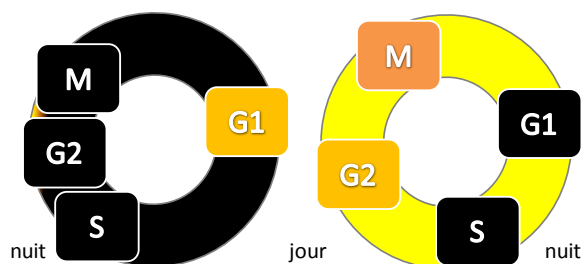


Figure 99. Organisation générale du cycle cellulaire des microalgues (à gauche) et organisation particulière chez *Thalassiosira weissflogii* dans nos expériences (à droite).

statut énergétique (Cf. p114). Cette curiosité dans le monde des microalgues confère à cette espèce une double particularité pour sa synchronisation. L'existence de points de blocage sur deux phases différentes du cycle complique la synchronisation de la population (Cf. p43), et affecte le déroulement du cycle des cellules synchronisées (Figure 99). Les caractéristiques physiologiques spécifiques étant généralement le fruit d'une longue sélection, il se pose la question de l'avantage évolutif que cette particularité peut conférer à *Thalassiosira weissflogii*.



Image 6. Tronc couvert de mousses et lichens. Deux espèces (mousses et lichens) cohabitent sur le même tronc, mais dans deux niches écologiques distinctes, notamment par l'élévation et l'hygrométrie.

En écologie, le principe d'exclusion de Gause¹ stipule que deux espèces limitées par la même ressource ne peuvent coexister dans le même biotope². A l'équilibre, la plus compétitive aura éliminée l'autre, on dit que deux espèces ne peuvent partager la même niche écologique (Image 6). Ce principe est illustré par les modèles de compétition de Lotka et Volterra³. Dans l'océan, la grande diversité des organismes phytoplanctoniques constitue un paradoxe compte tenu du spectre étroit des ressources pour lesquelles ils entrent en compétition : c'est le paradoxe de Hutchinson⁴. La coexistence de différentes espèces s'explique en fait par les différents aspects que revêt la notion de niche écologique. En effet, cette notion ne se décrit pas seulement en termes spatial et trophique. Ici, c'est l'aspect temporel qui nous intéresse, c'est-à-dire l'incidence des fluctuations horaires de la ressource sur l'acquisition d'azote.

Ainsi, l'avantage évolutif offert par la synchronisation particulière de *Thalassiosira weissflogii* pourrait être d'acquérir de l'azote à des moments où la majorité des autres espèces de microalgues ne le font pas. En effet, la capacité qu'ont les diatomées d'acquérir l'azote la nuit n'est pas ubiquitaire dans le monde des microalgues (Clark *et al.* 2002a). L'absence d'acquisition d'azote au cours de la nuit est d'ailleurs cohérente avec le fait que la majorité des microalgues se divisent la nuit. La possibilité d'une acquisition nocturne d'azote n'est avantageuse que si la mitose n'est pas prépondérante au cours de la nuit. Les cellules finalement capables d'acquérir de l'azote la nuit aurait la primeur des apports nocturnes de substrat. Elles accèderaient, par exemple, en priorité aux

¹ Principe de Gause énoncé en 1934, Cf. Ricklefs & Miller 2005

² Biotope : ensemble des éléments abiotiques caractérisant un milieu

³ Modèles de Lotka et Volterra formulés en 1925 et 1926

⁴ Paradoxe de Hutchinson énoncé en 1961, Cf. Ricklefs & Miller 2005

pulses d'azote inorganique excrété par le zooplancton¹, qui remonte en zone euphotique au cours de la nuit (Haupt *et al.* 2009).

Il ne faut cependant pas perdre de vue que l'organisation classique du cycle cellulaire (Figure 99 gauche) doit elle aussi présenter une logique évolutive. Reprenons l'hypothèse de Pittendrigh « *escape from light* » (Cf. p40) selon laquelle les processus cellulaires se seraient organisés pour isoler de nuit ceux sensibles à la lumière. En particulier, les phases de synthèse d'ADN (S) et de mitose (M) sont sensibles aux ultraviolets (UV), qui peuvent provoquer des mutations au sein patrimoine génétique (Häder & Sinha 2005). L'organisation classique du cycle cellulaire les éloigne de la phase de lumière (Figure 99). A l'inverse, celle de *Thalassiosira weissflogii*, expose les cellules en mitose au rayonnement lumineux et donc UV (Figure 99). Il est donc probable que *Thalassiosira weissflogii* soit dotée d'une propriété particulière qui lui permette de résister à ce stress. La barrière physique du frustule, et surtout la capacité de cette espèce à produire des molécules absorbant dans l'UV (Zudaire & Roy 2001) doivent lui conférer la protection nécessaire pour réduire les risques liés à l'occurrence des phases S et M le jour. Ainsi, les caractéristiques particulières de *Thalassiosira weissflogii*, tant physiologiques (organisation et synchronisation singulières du cycle cellulaire, possibilité d'acquisition nocturne) que morphologiques (protection physique de l'ADN par un frustule) ont pu lui conférer un caractère euryèce. En d'autres termes, cette espèce présente une niche écologique étendue qui lui permet de s'adapter rapidement aux changements des conditions de croissance, et *in fine* d'optimiser sa compétitivité et son *fitness* (valeur sélective). Rappelons que nous avons déjà remarqué ce caractère en notant la formidable diversité d'habitats dans lesquels cette espèce peut se développer (Cf. p68), démontrant des aptitudes eurytherme (climats tropicaux, tempérés, et froids) et euryhaline (eaux marines, saumâtres et lacustres).

5. De l'impact écologique de nos hypothèses.

Nos hypothèses sont issues d'expériences conduites au laboratoire sur des cultures monospécifiques. La souche utilisée a été isolée il y a des années, et est depuis exposée à des pressions de sélection très différentes de celles existantes dans le milieu marin. Dans ce contexte, quelles sont les applications possibles et pertinentes de nos résultats dans le cadre de l'océan réel ?

L'impact macroscopique du cycle cellulaire est dépendant de la synchronisation de la population. Or, celle-ci est le résultat de deux phénomènes indépendants (Chapitre IV). D'une part, le

¹ Nous noterons toutefois que la forme d'azote excrété par le zooplancton est l'ammonium, notre étude ayant portée sur l'absorption de nitrates.

cycle cellulaire contient plusieurs points de contrôle spécifiques aux conditions de croissance (lumière, azote, silice...). Au cours de la nuit, les cellules se bloquent au niveau du point de contrôle spécifique à la lumière, permettant la synchronisation des cellules exposées à un cycle lumineux diurne. Cependant, une limitation par l'azote (qui ajoute un point de blocage dans le cycle) et la variabilité du signal de lumière reçu dans une couche de mélange tendent à désynchroniser la population (Chapitre V). D'autre part, la synchronisation est favorisée par l'existence d'une horloge interne, qui fixe des fenêtres temporelles pendant lesquelles les cellules se divisent majoritairement (Chapitre IV).

Dans une couche de mélange, chaque cellule reçoit un signal de lumière qui dépend de sa trajectoire. Divers résultats montrent que la synchronisation dépend de la fréquence des oscillations de l'éclairement. A haute fréquence, la population se désynchronise massivement (*Cf.* expérience *ML*), alors qu'elle reste fortement synchronisée quand la période des oscillations est supérieure à la journée (*Cf.* expérience *ML2*, Pawlowski 2004). En zone stratifiée, les cellules sont exposées à un cycle lumineux diurne normal qui permet une synchronisation maximale (expériences *témoin*). Néanmoins, la stratification se caractérise souvent par des conditions nutritionnelles limitantes qui sont propices à la désynchronisation (expériences *Nlim*). Ces éléments nous conduisent à penser que le plus haut degré de synchronisation se trouvera en zone stratifiée non limitée en azote, c'est-à-dire au niveau du maximum de chlorophylle. Nous pensons que c'est dans cette zone que l'impact du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote est le plus fort.

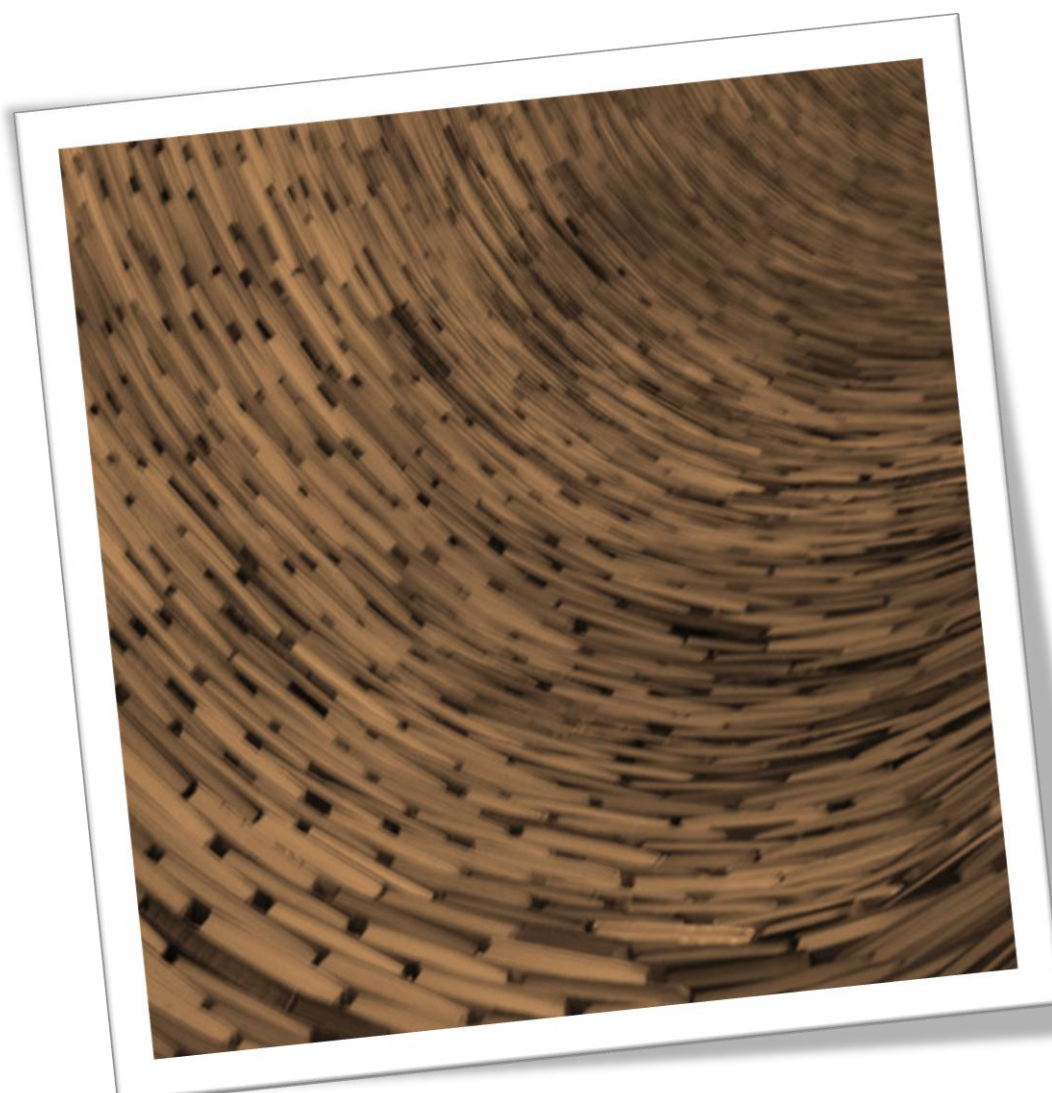
Si les diatomées *en général* se synchronisent difficilement (Claquin et al. 2004), nos expériences montrent que *T. weissflogii* se synchronise *particulièrement* difficilement. En effet, même en conditions de croissance optimale (expérience *témoin*), le taux de division de la population n'est jamais nul et la variation diurne du pG1 ne dépasse pas 40 points. Nous supposons que l'existence de deux fenêtres quotidiennes de division et de deux points de blocage dans le cycle cellulaire peut en être l'explication. Somme toute, *T. weissflogii* est peut être un bon modèle biologique pour l'étude de certains processus physiologiques, mais il n'est peut être pas le meilleur modèle pour travailler sur des populations synchronisées. Dans l'idée que nos constations peuvent s'appliquer à d'autres espèces de microalgues, il nous semble intéressant de tester la validité de nos hypothèses sur des espèces dont la synchronisation a été démontrée dans le milieu naturel. Parmi elles, les algues picoplanctoniques sont particulièrement connues pour se diviser de façon synchrone dans le milieu marin (Carpenter & Campbell 1988, Vaulot & Marie 1999, Jacquet *et al.* 2001), mais certains flagellés (Sweeney & Hastings 58) et certaines diatomées (Smayda 1975, Williamson 1980) peuvent également montrer ce genre de caractéristiques.

Quand bien même ces études permettraient de préjuger d'un effet notable du cycle cellulaire dans le milieu marin, sa quantification nécessiterait d'investir dans des mesures *in situ* à haute fréquence. L'idéal serait de pouvoir suivre les dynamiques de l'acquisition d'azote et du cycle cellulaire, mais cette entreprise s'avère délicate car ces mesures sont difficiles à réaliser en milieu marin, notamment pour deux raisons. D'un côté, la densité cellulaire océanique est faible, comparée à celle de nos bioréacteurs. De l'autre, plusieurs espèces coexistent dans le même environnement. Notre méthode du suivi du cycle cellulaire impliquerait une large utilisation de produits de fixation et de marquage et nécessiterait l'isolation des différentes populations au cytomètre en flux. Une autre approche permettant d'identifier la phase mitotique est d'identifier optiquement la proportion d'entités formées de deux cellules attachées (ou doublets, Braunwarth & Sommer 1985), ou la proportion de cellules en mitose (cette phase est caractérisée par l'absence de membrane nucléaire chez les eucaryotes). Nous pourrions songer au développement d'une méthode d'imagerie afin d'automatiser ce type de mesure. Cependant, le procédé qui nous apparaît le plus simple reste le dénombrement des particules phytoplanctoniques et l'identification des périodes de division. Stemmann *et al.* (2008) ont utilisé cette méthode pour suivre la synchronisation des microalgues au sein du tourbillon de l'océan Pacifique Sud. Ils reportèrent, au niveau du maximum de Chl_a, une variation diurne de l'abondance des microalgues avec un maximum en fin de journée. Enfin, la cinétique d'acquisition d'azote peut être mesurée par incubation en utilisant des isotopes de l'azote (¹⁵NO₃, Raimbault & Garcia 2008).

Pour conclure, nous pensons que la portée écologique de nos hypothèses devrait être davantage explorée. En effet, nous supposons que l'interruption de la prise d'azote observée pendant la phase de mitose peut provoquer, sur des populations synchronisées, des variations de la concentration en substrat dans le milieu. Nous pouvons préjuger que ces variations peuvent avoir un effet synchronisant sur d'autres populations phytoplanctoniques (Bernard *et al.* 1996 ont montré que des variations périodiques d'apport nutritif pouvaient synchroniser des populations de microalgues). Au final, nous pensons que cette dynamique peut avoir des effets différents sur chaque population en fonction des caractéristiques de son métabolisme (capacité à acquérir l'azote de nuit, affinité pour le substrat...). En créant différentes niches écologiques, la discontinuité de l'acquisition d'azote engendrée par le cycle cellulaire pourrait donc agir sur la composition des communautés de microalgues. Dans ce sens, Vaultot & Marie (1999) mettent en évidence un déphasage du cycle cellulaire de plusieurs populations synchronisées en milieu stratifié. En surface, la division de *Prochlorococcus* survient peu avant le crépuscule, celle de *Synechococcus* a lieu 2h plus tard, et celle des picoeucaryotes suit 7h plus tard. Les auteurs lient ces observations aux métabolismes différents de ces populations. Les procaryotes ne peuvent utiliser les nutriments que de jour, mais ils le font

plus rapidement que les picoeucaryotes. En conséquence, ils se divisent en phase éclairée mais leur capacité de réparation de l'ADN leur permet de compenser l'effet délétère des UV. Cette logique de sélection nous amène jusqu'aux expériences de compétitions d'Ahn et al. (2002), couplant la mesure et la modélisation de la cinétique diurne d'acquisition d'azote de plusieurs espèces de microalgues. Ils démontrent que la diversité spécifique de la communauté phytoplanctonique est favorisée quand les différentes espèces en présence ont des stratégies d'acquisition de substrat différentes.

Bibliographie



Book Wormhole, by davespertine

Bibliographie

- Agusti S., Duarte C. M., Llabres M., Agawin N. S. R., Kennedy H.** (2009) Response of coastal Antarctic phytoplankton to solar radiation and ammonium manipulation: An in situ mesocosm experiment. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences* **114**
- Ahn C.Y., Chung, A.S., Oh, H.M.** (2002) Diel rhythm of algal phosphate uptake rates in P-limited cyclostats and simulation of its effect on growth and competition. *Journal of Phycology* **38**: 695-704
- Aminot A., Berlin, C., Chapelle, A., Guillaud, J.F., Joanny, M., Lefebvre, A., Ménesguen, A., Merceron, M., Piriou, J.Y., Souchu, P.** (2001) L'eutrophisation des eaux côtières. Revue de la situation en France. Rapport IFREMER pour la commission européenne.
- Archer D., Martin P., Buffett B., Brovkin V., Rahmstorf S., Ganopolski A.** (2004) The importance of ocean temperature to global biogeochemistry. *Earth and Planetary Science Letters* **222**: 333-348
- Arhonditsis G.B., Brett M.T.** (2004) Evaluation of the current state of mechanistic aquatic biogeochemical modeling. *Marine Ecology-Progress Series* **271**: 13-26
- Arino O., Kimmel M.** (1993) Comparison of approaches to modeling of cell population dynamics. *SIAM J. Appl. Math.* **53**: 1480-1504
- Armstrong R. A.** (2006) Optimality-based modeling of nitrogen allocation and photo acclimation in photosynthesis. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **53**: 513-531
- Audigié C., F. Zonszain** (1993) *Biochimie métabolique*, Biosciences et techniques. Editions Doin
- Baretta-Bekker J. G., Baretta J. W., Rasmussen E. K.** (1995) The Microbial Food-Web in the European-Regional-Seas-Ecosystem-Model. *Netherlands Journal of Sea Research* **33**: 363-379
- Baumann K.H. Böckel B., Frenz M.** (2004) *Coccolithophores: from molecular processes to global impact*. Springer
- Beardall J., Burger-Wiersma T., Rijkeboer M., Sukenik A., Lemoalle J., Dubinsky Z., Fontvielle D.** (1994) Studies on enhanced post-illumination respiration in microalgae. *J. Plankton Res.* **16**: 1401-1410
- Benschneider K., Robinson R.J.** (1952) A new spectrophotometric determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research* **11**: 87-96
- Berdalet E., Latasa M., Estrada M.** (1992) Variations in biochemical parameters of *Heterocapsa sp* and *Olisthodiscus luteus* grown in 12-12 light-dark cycles .1. Cell-cycle and nucleic-acid composition. *Hydrobiologia* **238**: 139-147
- Berges J.A., Charlebois D.O., Mauzerall D.C., Falkowski P.G.** (1996) Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. *Plant Physiology* **110**
- Bernard O., Malara G., Sciandra A.** (1996) The effect of a controlled fluctuating nutrient environment on continuous cultures of phytoplankton monitored by computers. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology* **197**: 263-278
- Bhaud Y., Salmon J. M., Soyergobillard M. O.** (1991) The complex cell-cycle of the dinoflagellate protist *Cryptecodinium-cohnii* as studied in vivo and by cytofluorometry. *Journal of Cell Science* **100**: 675-&
- Binder B.J., Durand M.D.** (2002) Diel cycles in surface waters of the equatorial Pacific. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **49**: 2601-2617

- Blain S., Queguiner B., Armand L., Belviso S., Bombled B., Bopp L., Bowie A., Brunet C., Brussaard C., Carlotti F., Christaki U., Corbiere A., Durand I., Ebersbach F., Fuda J. L., Garcia N., Gerringa L., Griffiths B., Guigue C., Guillermin C., Jacquet S., Jeandel C., Laan P., Lefevre D., Lo Monaco C., Malits A., Mosseri J., Obernosterer I., Park Y. H., Picheral M., Pondaven P., Remenyi T., Sandroni V., Sarthou G., Savoye N., Scouarnec L., Souhaut M., Thuiller D., Timmermans K., Trull T., Uitz J., Van Beek P., Veldhuis M., Vincent D., Viollier E., Vong L., Wagener T.** (2007) Effect of natural iron fertilization on carbon sequestration in the Southern Ocean. *Nature* **446**: 1070-U1071
- Borowitzka M.A.** (1997) Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* **9**: 393-401
- Borowitzka M.A.** (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* **70**: 313-321
- Braunwarth C., Sommer U.** (1985) Analyses of the in Situ Growth Rates of Cryptophyceae by Use of the Mitotic Index Technique. *Limnology and Oceanography* **30**: 893-897
- Bresciani C., Grillo C., Melchiorre N., Bertolotto R., Ferrari A., Vivaldi B., Icardi G., Gramaccioni L., Funari E., Scardala S.** (2006) *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Eurosurveillance* **11**
- Brunelle S.A., Hazard E.S., Sotka E.E., Van Dolah F.M.** (2007) Characterization of a dinoflagellate cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle. *Journal of Phycology* **43**: 509-518
- Bruyant F., Babin M., Genty B., Prasil O., Behrenfeld M.J., Claustre H., Bricaud A., Garczarek L., Holtzendorff J., Koblizek M., Dousova H., Partensky F.** (2005) Diel variations in the photosynthetic parameters of *Prochlorococcus* strain PCC 9511: Combined effects of light and cell cycle. *Limnology and Oceanography* **50**: 850-863
- Bruyant F., Babin M., Sciandra A., Marie D., Genty B., Claustre H., Blanchot J., Bricaud A., Rippka R., Boulben S., Louis F., Partensky F.** (2001) An axenic cyclostat of *Prochlorococcus* PCC 9511 with a simulator of natural light regimes. *Journal of Applied Phycology* **13**: 135-142
- Brzezinski M. A., Conley D.J.** (1994) Silicon deposition during the cell cycle of *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) determined using dual rhodamine 123 and propidium iodide staining. *Journal of Phycology* **30**: 45-55
- Brzezinski M.A., Nelson D. M.** (1988) Interactions between pulsed nutrient supplies and a photocycle affect phytoplankton competition for limiting nutrients in long-term culture. *Journal of Phycology* **24**: 346-356
- Brown K. L., Twing K. I., Robertson D. L.** (2009) Unraveling the regulation of nitrogen assimilation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): Diurnal variations in transcript levels for five genes involved in nitrogen assimilation. *Journal of Phycology* **45**: 413-426
- Burmester D. E.** (1979) Unsteady continuous culture of phosphate-limited *Monochrysis lutheri* Droop - Experimental and Theoretical-Analysis. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology* **39**: 167-186
- Buonpy H.R., Cbeel L.S., Andr N.A.** 1981. Auto-selection of very rapidly growing microorganisms. *Adv. Biotechnol.* **3**:235-241.
- Cadore J.P., Bernard O.** (2008) La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie* **202**: 201-211
- Caperon J.** (1965) Dynamics of nitrate limited growth of *Isochrysis galbana* populations. Thèse de doctorat. Université de Californie, Etats-Unis.
- Caperon J.** (1967) Population growth in micro-organisms limited by food supply. *Ecology* **48**: 715-&
- Caperon J.** (1968) Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations. *Ecology* **49**: 866-&

Caperon J., Meyer J. (1972) Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton--II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* **19**: 619-632

Caraus I. (2002) The algae of Romania. *In* Biologie, Universitatea Bacau, 694pp

Cetta C. M., Anderson D. M. (1990) Cell-cycle studies of the dinoflagellates *Gonyaulax polyedra* Stein and *Gyrodinium uncatenum* Hulburt during asexual and sexual reproduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **135**: 69-84

Chaumont D. (1993) Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology* **5**: 593-604

Chen Y.B., Zehr J.P., Mellon M. (1996) Growth and nitrogen fixation of the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. Ims 101 in defined media: evidence for a circadian rhythm. *Journal of Phycology* **32**: 916-923

Chisholm S.W., Brand L.E. (1981) Persistence of cell division phasing in marine phytoplankton in continuous light after entrainment to light : dark cycles. *J. exp mar. Biol. Ecol.* **51**: 107-118

Chisholm S.W., Costello J.C. (1980) Influence of environmental factors and population composition on the timing of cell division in *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) grown on light/dark cycles. *Journal of Phycology* **16**: 375-383

Chisholm S.W., Armbrust E.V., Olson R.J. (1986) The individual cell in phytoplankton ecology: cell cycles and applications of flow cytometry. *In* Li W.K.W. & Platt T., ed, *Photosynthetic Picoplankton*, Vol 214. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, Ottawa, pp 343-369

Claquin P., Kromkamp J.C., Martin-Jezequel V. (2004) Relationship between photosynthetic metabolism and cell cycle in a synchronized culture of the marine alga *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *Eur. Journal of Phycology* **39**: 33-41

Clark D.R., Flynn K.J., Owens N.J.P. (2002) The large capacity for dark nitrate-assimilation in diatoms may overcome nitrate limitation of growth. *New Phytologist* **155**: 101-108

Clark D.R., Flynn K.J., Owens N.J.P. (2002) N-assimilation in the noxious flagellate *Heterosigma carterae* (raphidophyceae): dependence on light, N-source, and physiological state. *Journal of Phycology* **38**: 503-512

Cloern J. E., Grenz C., VidegarLucas L. (1995) An empirical model of the phytoplankton chlorophyll:carbon ratio - The conversion factor between productivity and growth rate. *Limnology and Oceanography* **40**: 1313-1321

Cochlan W. P., Harrison P. J., Denman K. L. (1991) Diel periodicity of nitrogen uptake by marine phytoplankton in nitrate-rich environments. *Limnology and Oceanography* **36**: 1689-1700

Collos Y. (1984) Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms .5. Interspecific variability in biomass and uptake during nitrogen starvation and resupply. *Marine Ecology-Progress Series* **17**: 25-31

Collos Y., Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P., Souchu P. (2004) Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology* **40**: 96-103

Collos Y., Vaquer A., Souchu P. (2005) Acclimation of nitrate uptake by phytoplankton to high substrate levels. *Journal of Phycology* **41**: 466-478

Comeau S., Gorsky G., Jeffre R., Teyssié J.L., Gattuso J.P. (2009) Impact of ocean acidification on a key Arctic pelagic mollusc (*Limacina helicina*). *Biogeosciences* **6**: 1877-1882

Conan P., Sondergaard M., Kragh T., Thingstad F., Pujo-Pay M., Williams P., Markager S., Cauwet G., Borch N. H., Evans D., Riemann B. (2007) Partitioning of organic production in marine plankton communities: The effects of inorganic nutrient ratios and community composition on new dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* **52**: 753-765

- Cooper G.M.** (1999) La cellule: une approche moléculaire. De Boeck Université
- Coquillard P., Hill D.R.C.** (1997) Modélisation et simulation d'écosystèmes: Des modèles déterministes aux simulations à événements discrets. Masson, Recherche en Écologie, Paris
- Cox P.M., Betts R.A., Jones C.D., Spall S.A., Totterdell I.J.** (2000) Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. **408**: 184-187
- Craven P., Wahba G.** (1979) Smoothing noisy data with spline functions. Estimating the correct degree of smoothing by the method of generalized cross-validation. *Numerische Mathematik* **31**: 377-403
- Cuhel R. L., Ortner, P. B., Lean D. R. S.** (1984) Night Synthesis of Protein by Algae. *Limnology and Oceanography* **29**: 731-744
- Day S.A., Wickham R.P., Entwisle T.J., Tyler P.A.** (1995). Bibliographic check-list of non-marine algae in Australia. *Flora of Australia Supplementary Series* 4.
- Del Valle Daniela A., Kieber David J., Toole Dierdre A., Bisgrove John, Kiene Ronald P.** (2009) Dissolved DMSO production via biological and photochemical oxidation of dissolved DMS in the Ross Sea, Antarctica. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **56**: 166-177
- Delille B., Harlay J., Zondervan I., Jacquet S., Chou L., Wollast R., Bellerby R.G.J., Frankignoulle M., Borges A. V., Riebesell U., Gattuso J.P.** (2005) Response of primary production and calcification to changes of pCO₂ during experimental blooms of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Global Biogeochem. Cycles* **19**
- Demanche J.M., Curl H.C., Lundy D.W., Donaghay P.L.** (1979) The rapid response of the marine diatom *Skeletonema costatum* to changes in external and internal nutrient concentration. *Marine Biology* **53**: 323-333
- Doney S. C., Glover D. M., Najjar R. G.** (1996) A new coupled, one-dimensional biological-physical model for the upper ocean: Applications to the JGOFS Bermuda Atlantic time-series study (BATS) site. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **43**: 591-624
- Dortch O., Thompson P. A., Harrison P. J.** (1991) Short-term interaction between nitrate and ammonium uptake in *Thalassiosira Pseudonana* - Effect of preconditioning nitrogen-source and growth-rate. *Marine Biology* **110**: 183-193
- Droop M.R.** (1968) Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in. *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **48**: 689-733
- Dubinsky Z., Berman-Frank I.** (2001) Uncoupling primary production from population growth in photosynthesizing organisms in aquatic ecosystems. *Aquatic Sciences* **63**: 4-17
- Dugdale R. C.** (1967) Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnology and Oceanography* **12**: 685-695
- Dunlap J.C.** (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290
- Dyjuizien D.E., Hartl D.L.** 1983 Selection in chemostats. *Microbiology Reviews*. 47(2):150-168.
- Edmunds L.N. Jr** (1966) Studies on synchronously dividing cultures of *Euglena gracilis* Klebs (strain Z). III. Circadian components of cell division. *J. Cell Physiol.* **67**: 35-44
- Edmunds L.N. Jr, Funch R.R.** (1969) Circadian rhythm of cell division in *Euglena*: effects of a random illumination regime. *Science* **165**: 500-503
- Edmunds L. N. Jr, Adams K. J.** (1981) Clocked Cell-Cycle Clocks. *Science* **211**: 1002-1013
- Ehret C.F., Wille J.J** (1970) The photobiology of circadian rhythms in protozoa and other eukaryotic microorganisms. In Halldad. P., ed, *Photobiology of Microorganisms*, New York, pp 369-416

- Eppley R.W., Coatsworth J.L.** (1966) Culture of the marine phytoplankter, *Dunaliella tertiolecta*, with light-dark cycles. *Arch. Microb.* **55**: 66-80
- Eppley R.W., Rogers J.N., McCarthy J.J.** (1969) Half Saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **14**: 912-921
- Eppley R.W., Strickland J.D.H.** (1968) Kinetics of marine phytoplankton growth. *In* *Advances in the Microbiology of the Sea*. Droop M.R, Wood E.J.F. ed., Academic Press, New York, pp 23-62
- Eppley R.W., Rogers J.N., McCarthy J.J., Sournia A., Coatsworth J.L.** (1971) Light/dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankters *Skeletonema costatum* and *Coccolithus huxleyi* in N-limited chemostat culture. *Journal of Phycology* **7**: 150-154
- Escaravage V., Prins T. C.** (2002) Silicate availability, vertical mixing and grazing control of phytoplankton blooms in mesocosms. *Hydrobiologia* **484**: 33-48
- Esposito S., Botte V., Iudicone D., Ribera D'alcala M.** (sous presse) Numerical analysis of cumulative impact of phytoplankton photoresponses to light variation on carbon assimilation. *Journal of Theoretical Biology*
- Evans G.T., Garçon V.** (1997) One-Dimensional Models of Water Column Biogeochemistry; JGOFS report n°23. *In*. JGOFS, Toulouse, France.
- Falcatore A., Bowler C.** (2002) Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 109-130
- Falkowski P.G., Dubinsky Z., Wyman K.** (1985) Growth irradiance relationships in phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **30**: 311-321
- Falkowski P. G., Stone D. P.** (1975) Nitrate uptake in marine phytoplankton: Energy sources and the interaction with carbon fixation. *Marine Biology* **32**: 77-84
- Fasham M. J. R.** (1995) Variations in the Seasonal Cycle of Biological Production in Sub-Arctic Oceans - a Model Sensitivity Analysis. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **42**: 1111-1149
- Flynn K. J., Fasham M. J. R.** (2003) Operation of light-dark cycles within simple ecosystem models of primary production and the consequences of using phytoplankton models with different abilities to assimilate N in darkness. *Journal of Plankton Research* **25**: 83-92
- Flynn K.J., Martin-Jezequel V.** (2000) Modeling Si-N-limited growth of diatoms. *J. Plankton Res.* **22**: 447-472
- Fujimoto Y., Iwamoto H., Kato A., Yamada K.** (1956) Studies on the growth of *Chlorella* by continuous cultivation. 1. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* **20**: 13-18
- Ganzer B., Messerschmid E.** Integration of an algal photobioreactor into an environmental control and life support system of a space station. *Acta Astronautica* **65**: 248-261
- Gamo T.** (1999) Global warming may have slowed down the deep conveyor belt of a marginal sea of the northwestern Pacific: Japan Sea. *Geophys. Res. Lett.* **26**: 3137-3140
- Garett R.H., Grisham C.M., Lubochinsky B.** (2000) *Biochimie*. De Boeck Université
- Geider R.J., Macintyre H.L., Kana T.M.** (1998) A dynamic regulatory model of phytoplankton to light, nutrients and temperature. *Limnology and Oceanography* **43**: 679-694
- Gerath M.W., Chisholm S.W.** (1989) Change in photosynthetic capacity over the cell cycle in light/dark-synchronized *Amphidinium carterils* due solely to the photocycle. *Plant Physiology* **91**: 999-1005
- GIEC (experts du ~)** (2007) Fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *In*. IPCC, Geneve, Suisse, p 104

- Goto K., Johnson C.H.** (1995) Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **129**: 1061-1069
- Granbom M., Pedersén M., Kadel P., Lüning K.** (2001) Circadian rhythm of photosynthetic oxygen evolution in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): dependence on light quantity and quality. *Journal of Phycology* **37**: 1020-1025
- Gray J.S.** (1997) Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* **6**: 153-175
- Grobbelaar N., Huang T. C., Lin H. Y., Chow T. J.** (1986) Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* Rf-1. *Fems Microbiology Letters* **37**: 173-177
- Guillard R.R., Ryther J.H.** (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239
- Häder D.P., Sinha, R.P.** (2005) Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **571**: 221-233
- Hällfors G.** (2004) Checklist of Baltic Sea phytoplankton species. In *Baltic Sea Environment Proceedings*, Vol. 95
- Hannach G., Siegleo A.C.** (1998) Photoinduction of UV-absorbing compounds in six species of marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **174**: 207-222
- Harder W., Kuenen J.G., Matin A.** (1977) Microbial selection in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* **43**: 1-24.
- Harmer S. L., Hogenesch L. B., Straume M., Chang H. S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J. A., Kay S. A.** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**: 2110-2113
- Hasting J.W., Astracham L., Sweeney B.M.** (1961) A persistent daily rhythm in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.* **45**: 69-76
- Hastings J.W., Rusak B., Boulos Z.** (1991) Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In *Neural and integrative animal physiology*. Wiley-Liss, Washington D.C., pp 535-546
- Haupt F., Stockenreiter M., Baumgartner M., Boersma M., Stibor H.** (2009) *Daphnia* diel vertical migration: implications beyond zooplankton. *Journal of Plankton Research* **31**: 515-524
- Healey F.P.** (1985) Interacting effects of light and nutrient limitation on the growth rate of *Synechococcus linearis*. *Journal of Phycology* **21**: 134-146
- Heath M. R., Spencer C. P.** (1985) A model of the cell-cycle and cell-division phasing in a marine diatom. *Journal of General Microbiology* **131**: 411-425
- Hellweger F.L.** (2008) The role of inter-generation memory in diel phytoplankton division patterns. *Ecological Modelling* **212**: 382-396
- Hellweger F.L., Kianirad E.** (2007) Individual-based modelling of phytoplankton: Evaluating approaches for applying the cell quota model. *Journal of Theoretical Biology* **249**: 554-565
- Hildebrand M., Dahlin K.** (2000) Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae): mRNA levels controlled by nitrogen source and by cell cycle. *Journal of Phycology* **36**: 702-713
- Holme D.J., Peck H.** (1998) *Analytical Biochemistry*. Prentice Hall
- Howard A., Pelc S. R.** (1951) Synthesis of Nucleoprotein in Bean Root Cells. *Nature* **167**: 599-600

- Huang C., Qi Y.** (1997) The abundance cycle and influence factors on red tide phenomena of *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae) in Dapeng Bay, the South China Sea. *J. Plankton Res.* **19**: 303-318
- Iglesias-Rodriguez M., Debora, Halloran Paul R., Rickaby Rosalind E. M., Hall Ian R., Colmenero-Hidalgo Elena, Gittins John R., Green Darryl R. H., Tyrrell Toby, Gibbs Samantha J., Dassow Peter Von, Rehm Eric, Armbrust E. Virginia, Boessenkool Karin P.** (2008) Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world. *Science* **320**: 336-340
- Jacquet S., Partensky F., Marie D., Casotti R., Vaulot D.** (2001) Cell cycle regulation by light in *Prochlorococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 782-790
- Johnson C.H., Golden S.S., Ishiura M., Kondo T.** (1996) Circadian clocks in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **21**: 5-11
- Johnson C.H., Knight M., Trewavas A., Kondo T.** (1998) A clockwork green: Circadian programs in photosynthetic organisms. In Millar A.J. & Lumsden P.J., ed, *Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants*. Bios, Oxford, pp 1-34
- Kang L. K., Hwang S. P. L., Gong G. C., Lini H. J., Chen P. C., Chang, J.** (2007) Influences of nitrogen deficiency on the transcript levels of ammonium transporter, nitrate transporter and glutamine synthetase genes in *Isochrysis galbana* (Isochrysidales, Haptophyta). *Phycologia* **46**: 521-533
- Karentz D.** (1983) Patterns of DNA-synthesis and cell-division in marine dinoflagellates. *Journal of Protozoology* **30**: 581-588
- Katano T., Lee J., Lee Y. J., Kim M. K., Lee C. G., Jin E. S., Kang S. H., Han M. S.** (2009) Effect of temperature on inorganic carbon acquisition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Freshwater Ecology* **24**: 255-260
- Kermarec F. Dor F., Armengaud A., Charlet F., Kantin R., Sauzade D., De Haro L.** (2008) Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters. *Environnement, Risques & Santé* **7**: 357-363
- Klein P., Coste B.** (1984) Effects of wind-stress variability on nutrient transport into the mixed layer. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers* **31**: 21-37
- Klevecz R. K.** (1976) Quantized generation time in mammalian cells as an expression of the cellular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 4012-4016
- Kondo T. Mori T., Lebedeva N. V., Aoki S., Ishiura M., Golden, S. S.** (1997) Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science* **275**: 224-227
- Kondo T., Tsinoremas N.F., Golden S.S., Johnson C.H., Kutsuna S., Ishiura M.** (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* **266**: 1233-1236
- Kromkamp J.C., Claquin P.** (2005) Role of the cell cycle in the metabolism of marine microalgae. In Suba Rao D.V., ed, *Algal cultures, analogues of blooms and applications*, Science Publishers Enfield (NH) USA, pp 385-406
- Kroon B.M.A., Latasa M., Ibelings B.W., Mur L.R.** (1992) The effect of dynamic light regimes on *Chlorella*. *Hydrobiologia* **238**: 71-78
- Kruger N.J., Von Schaewen A.** (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 236-246
- Krys S., Frémy J.** (2002) Phycotoxines et produits de la mer: risques sanitaires associés et mesures de prévention. *Revue Française des Laboratoires* **2002**: 29-38
- Kuwano K., Sakurai R., Motozu Y., Kitade Y., Saga N.** (2008) Diurnal cell division regulated by *gating* the G1/S transition in *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **44**: 364-373
- Kwok A.C.M., Wong J.T.Y.** (2005) Lipid biosynthesis and its coordination with cell cycle progression. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1973-1986

- Kuroiwa T.** (1991) The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. In Jeon K.W & Friedlander M. ed, International Review of Cytology. A Survey of Cell Biology, Vol 128, San Diego, Etats-Unis, pp 1-62
- Landsberg J.H., Flewelling L.J., Naar J.** (2009) *Karenia brevis* red tides, brevetoxins in the food web, and impacts on natural resources: Decadal advancements. Harmful Algae **8**: 598-607
- Lakin-Thomas P.** (2006) New models for circadian systems in microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. **259**: 1-6
- Laws E.A., Wong D.C.L.** (1978) Studies of carbon and nitrogen metabolism by three marine phytoplankton species in nitrate limited continuous culture. Journal of Phycology **14**: 406-416
- Le Floc'h A.** (2002) Etude expérimentale des limitations simultanées de l'azote et de la lumière sur la croissance de *Rhodomonas salina*. Aix-Marseille II
- Lewis W. M.** (1984) The diatom sex clock and its evolutionary significance. American Naturalist **123**: 73-80
- Liebig (von ~) J.F.** (1840) Organic chemistry in its applications to agriculture and physiology. Taylor and Walton, London
- Lim P. T., Leaw C. P., Usup G., Kobiyama A., Koike K., Ogata T.** (2006) Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). Journal of Phycology **42**: 786-799
- Lomas M.W., Glibert P.M.** (1999) Interactions between NH_4^+ and NO_3^- uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures. Marine Biology **133**: 541-551
- Lomas M.W., Glibert P.M.** (2000) Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. Journal of Phycology **36**: 903-913
- Long S. P., Humphries S., Falkowski P. G.** (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **45**: 633-662
- Macisaac J.J., Dugdale R.C.** (1972) Interactions of light and inorganic nitrogen in controlling nitrogen uptake in the sea. Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts **19**: 209-232
- Malara G., Sciandra A.** (1991) A multiparameter phytoplankton culture system driven by microcomputer. Journal of Applied Phycology **3**: 235-241
- Marsot P., Mouhri K., Cembella A. D.** (1992) Cyclic diurnal-variations in the assimilation of nitrate by *Phaeodactylum tricornutum*. Plant Physiology and Biochemistry **30**: 665-673
- Martin G. A., Hempling W.P.** 1976. A method for the regulation of microbial population density during continuous culture at high growth rates. Arch. Microbiol. **107**: 41-47.
- Martinez R.** (1991) Transient nitrate uptake and assimilation in *Skeletonema costatum* cultures subject to nitrate starvation under low irradiance. Journal of Plankton Research **13**: 499-512
- Mcclung C.R.** (2000) Circadian rhythms in plants: a millennial review. Physiologia Plantarum **109**: 359-371
- Mccormick M.J.** (1990) Potential changes in thermal structure and cycle of lake michigan due to global warming. Transactions of the American Fisheries Society **119**: 183-194
- Mckay R.M.L., Geider R.J., Laroche J.** (1997) Physiological and biochemical response of the photosynthetic apparatus of two marine diatoms to Fe stress. Plant Physiology **114**: 615-622
- Merzouk A., Levasseur M., Scarratt M., Michaud S., Gosselin M.** (2004) Influence of dinoflagellate diurnal vertical migrations on dimethylsulfoniopropionate and dimethylsulfide distribution and dynamics (St. Lawrence Estuary, Canada). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **61**: 712-720

- Mittag M.** (1998) Molecular mechanisms of clock-controlled proteins in phytoflagellates. *Protist* **149**: 101-107
- Mittag M.** (2001) Circadian rhythms in microalgae. *Int. Rev. Cytol.* **206**: 213-247
- Monod J.** (1950) La technique de culture continue. Théorie et applications. *Ann. Rev. Inst. Pasteur Paris.* **79**: 390-410
- Moreau D., Tomasoni C., Jacquot C., Kaas R., Le Guedes R., Cadoret J., Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., Roussakis C.** (2006) Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **22**: 97-103
- Mupparapu P., Brown W. S.** (2002) Role of convection in winter mixed layer formation in the Gulf of Maine, February 1987. *Journal of Geophysical Research-Oceans* **107**
- Needoba J.A., Harrison P.J.** (2004) Influence of low light and a light dark cycle on nitrate uptake, intracellular nitrate and nitrogen isotope fractionation by marine phytoplankton. *Journal of Phycology* **40**: 505-516
- Nelson D.M., Brand L.E.** (1979) Cell division periodicity in 13 species of marine phytoplankton on a light:dark cycle. *Journal of Phycology* **15**: 67-75
- Ng C., Lam C., Yeung P., Wong J.T.Y.** (1998) Flow cytometric analysis of nocodazole-induced cell-cycle arrest in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Journal of Applied Phycology* **10**: 569-572
- Novick A., Szilard, L.** (1950) Description of the chemostat. *Science* **112**: 715-716
- Olson R.J., Chisholm S.W.** (1983) Effects of photocycles and periodic ammonium supply on three marine phytoplankton species. I. Cell division patterns. *Journal of Phycology* **19**: 522-528
- Olson R.J., Chisholm S.W.** (1986) Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *J. Plankton Res.* **8**: 785-793
- Olson R.J., Vulot D., Chisholm S.W.** (1986) Effects of environmental stresses on the cell cycle of two
- Paasche E.** (1968) Marine plankton algae grown with light-dark cycles .2. *Ditylum brightwellii* and *Nitzschia turgidula*. *Physiologia Plantarum* **21**: 66-&
- Pascual M., Caswell H.** (1997) From the cell cycle to population cycles in phytoplankton-nutrient interactions. *Ecology* **78**: 897-912
- Pawlowski L., Bernard O., Le Floc'h E., Sciandra A.** (2002) Qualitative behaviour of a phytoplankton growth model in a photobioreactor. *In* Proceedings of the 15th IFAC World Congress, Barcelone, Espagne
- Pawlowski L.** (2004) Modélisation de l'incorporation du carbone photosynthétique en environnement marin piloté par ordinateur. Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Pickett-Heaps J.** (1991) Cell division in diatoms. *In* Jeon K.W & Friedlander M. ed, *International Review of Cytology. A Survey of Cell Biology.*, Vol 128, San Diego, Etats-Unis, pp 63-108
- Pittendrigh C.S.** (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **25**
- Pomponi S.A., Cucci T.L.** (1989) Separation and concentration of phytoplankton populations using centrifugal elutriation. *Cytometry* **10**: 580-596
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg B.A., Dusart J.** (2003) Microbiologie, Vol 2. De Boeck Université. p126
- Prézelin B.B.** (1992) Diel periodicity in phytoplankton productivity. *Hydrobiologia* **238**: 1-35

- Pulz O.** (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**: 287-293
- Putt M., Prézélin B.B.** (1988) Diel periodicity of photosynthesis and cell division compared in *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **24**: 315-324
- Qin G., Liu C.C.K., Richman N.H, Moncur J.E.T.** (2005) Aquaculture wastewater treatment and reuse by wind-driven reverse osmosis membrane technology: a pilot study on Coconut Island, Hawaii. *Aquacultural Engineering* **32**: 365-378
- Rabouille S., Staal M., Stal L. J., Soetaert K.** (2006) Modeling the dynamic regulation of nitrogen fixation in the cyanobacterium *Trichodesmium sp.* *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3217-3227
- Radchenko I., Il'yash L.** (2006) Growth and photosynthetic activity of diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. *Biology Bulletin* **33**: 242-247
- Ragni M., Ribera D'alcalà M.** (2007) Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricornutum*: pigment content. *Journal of Plankton Research* **29**: 141-156
- Raimbault P., Garcia N.** (2008) Evidence for efficient regenerated production and dinitrogen fixation in nitrogen-deficient waters of the South Pacific Ocean: impact on new and export production estimates. *Biogeosciences* **5**: 323-338
- Raimbault P., Mingazzini M.** (1987) Diurnal variations of intracellular nitrate storage by marine diatoms: effects of nutritional state. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology* **112**: 217-232
- Rayns D.G., Godward M.B.E.** (1965) A quantitative study of mitosis in *Eudorina elegans* in culture. *J. Exp. Bot.* **16**: 569-580
- Redfield A.C.** (1934) On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. In James Johnstone Memorial Volume. (ed. R.J. Daniel). University Press of Liverpool, pp. 177-192
- Renaud S. M., Thinh L. V., Lambrinidis G., Parry D. L.** (2002) Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* **211**: 195-214
- Rhee G.Y., Gotham I.J.** (1981) The effect of environmental factors on phytoplankton growth: light and the interactions of light with nitrate limitation. *Limnology and Oceanography* **26**: 649-659
- Ricklefs R.E., Miller G.** (2005) Ecologie. In: de Boeck, p 407
- Riebesell U., Zondervan I., Rost B., Tortell P.D., Zeebe R.E., Morel F.M.M.** (2000) Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *407*: 364-367
- Riley G.A.** (1946) Factors controlling phytoplankton populations on Georges Bank. *J. mar. Res.* **6**: 54-73
- Rivkin R. B., Putt M.** (1987) Diel periodicity of photosynthesis in polar phytoplankton - Influence on primary production. *Science* **238**: 1285-1288
- Roenneberg T., Morse D.** (1993) Two circadian oscillators in one cell. *Nature* **362**: 362-364
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G.** (1990) Diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge University Press
- Sahlsten E.** (1987) Nitrogenous nutrition in the euphotic zone of the Central North Pacific Gyre. *Marine Biology* **96**: 433-439
- Sarthou G., Timmermans K.R., Blain S., Tréguer P.** (2005) Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research* **53**: 25-42

- Savitzky A., Golay Mje** (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry* **36**: 1627-1639
- Sciandra A.** (1991) Coupling and uncoupling between nitrate uptake and growth rate in *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) under different frequencies of pulsed nitrate supply. *Marine Ecology Progress Series* **72**: 261-269
- Sciandra A., Amara R.** (1994) Effects of nitrogen limitation on growth and nitrite excretion rates of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Marine Ecology-Progress Series* **105**: 301-309
- Sciandra A., Gostan J., Collos Y., Descolas-Gros C., Leboulanger C., Martin-Jézéquel C., Denis M., Lefèvre D., Copin-Montégut C., Avril B.** (1997) Growth-compensating phenomena in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. *Limnology and Oceanography* **42**: 1325-1339
- Sciandra A., Lazzara L., Claustre H., Babin M.** (2000) Responses of growth rate, pigment composition and optical properties of *Cryptomonas sp.* to light and nitrogen stresses. *Marine Ecology-Progress Series* **201**: 107-120
- Shuter B.** (1979) Model of physiological adaptation in unicellular algae. *Journal of Theoretical Biology* **78**: 519-552
- Smayda T. J.** (1975) Phased cell-division in natural-populations of marine diatom *Ditylum brightwelli* and potential significance of diel phytoplankton behavior in sea. *Deep-Sea Research* **22**: 151-&
- Smith G.J., Zimmerman R.C., Randall A.S.** (1992) Molecular and physiological responses of diatoms to variable levels of irradiance and nitrogen availability: growth of *Skeletonema costatum* in simulated upwelling conditions. *Limnology and Oceanography* **37**: 989-1007
- Somers D.E.** (1999) The physiology and molecular bases of the plant circadian clock. *Plant Physiology* **121**: 9-19
- Sournia A.** (1974) Circadian periodicities in natural-populations of marine phytoplankton. *Advances in Marine Biology* **12**: 325-389
- Spudich J.L., Sager R.** (1980) Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark. *J. Cell Biol.* **85**: 136-145
- Stemmann L., Eloire D., Sciandra A., Jackson G. A., Guidi L., Picheral M., Gorsky G.** (2008) Volume distribution for particles between 3.5 to 2000 μ m in the upper 200 m region of the South Pacific Gyre. *Biogeosciences* **5**: 299-310
- Suzuki L., Johnson C.H.** (2001) Algae know the time of the day: circadian and photoperiodic programs. *Journal of Phycology* **37**: 933-942
- Sweeney B.M.** (1982) Interaction of the circadian cycle with the cell cycle in *Pyrocystis fusiformis*. *Plant Physiology* **70**: 272-276
- Sweeney B.M.** (1987) Rhythmic phenomena in Plants. Academic Press, London
- Sweeney B. M., Hastings J. W.** (1958) Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. *Journal of Protozoology* **5**: 217-224
- Syrett P.J.** (1981) Nitrogen metabolism of microalgae. In Platt T., ed, *Physiological basis of phytoplankton ecology*, Vol 210. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., pp 182-210
- Takahashi J.S.** (1992) Circadian clock genes are ticking. *Science* **258**: 238-240
- Thompson P.A., Levasseur M.E., Harrison P.J.** (1989) Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? *Limnology and Oceanography* **34**: 1014-1024

- Titlyanov E.A., Titlyanova T., Lüning K.** (1996) Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. II. The green alga *Ulva pseudocurvata*. *European Journal of Phycology* **31**: 181-188
- Turpin D. H., Elrifi I. R., Birch D. G., Weger H. G., Holmes J. J.** (1988) Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **66**: 2083-2097
- Turpin D. H., Vanlerberghe G. C., Amory A. M., Guy R. D.** (1991) The inorganic carbon requirements for nitrogen assimilation. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **69**: 1139-1145
- Tyson J. J., Hannsngen K. B.** (1986) Cell-growth and division - a deterministic probabilistic model of the cell-cycle. *Journal of Mathematical Biology* **23**: 231-246
- Ullrich W.R.** (1992) Nitrogen metabolism in plants. Oxford University Press.
- Vanlerberghe G.C., Huppe H.C., Vlossak K.D.M., Turpin D.H.** (1992) Activation of respiration to support dark NO_3^- and NH_4^+ assimilation in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* **99**: 495-500
- Vaulot D.** (1994) The cell cycle of phytoplankton: coupling cell growth to population growth. In NATO, ed, *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*, Il Ciocco, Italy, p 18
- Vaulot D., Chisholm S.W.** (1987) A simple model of the growth of phytoplankton populations in light/dark cycle. *J. Plankton Res.* **9**: 345-366
- Vaulot D., Marie D.** (1999) Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research - Oceans* **104**: 3297-3310
- Vaulot D., Olson R.J., Chisholm S.W.** (1986) Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *Experimental Cell Research* **167**: 38-52
- Vergaga J.J., Berges J.A., Falkowski P.G.** (1998) Diel pattern of nitrate reductase activity and protein levels in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **34**: 952-961
- Vincent W.F.** (1992) The daily pattern of nitrogen uptake by phytoplankton in dynamic mixed layer environments. *Hydrobiologia* **238**: 37-52
- Vitousek P.M., Howarth R.W.** (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* **13**: 87-115
- Walter W.G., Edmunds L.N.** (1973) Studies on the control of the rhythm of photosynthetic capacity in synchronized cultures of *Euglena gracialis*. *Plant Physiology* **51**: 250-258
- Wells W.A.** (2002) Does size matter? *Journal of Cell Biology* **158**: 1156-1159
- Wheeler P., Olson R. Chisholm S.** (1983) Effects of photocycles and periodic ammonium supply on three marine phytoplankton species. II. Ammonium uptake and assimilation. *Journal of Phycology* **19**: 528-533
- Williamson C.E.** (1980) Phased cell division in natural and laboratory populations of marine planktonic diatoms. *J. exp mar. Biol. Ecol.* **43**: 271-279
- Wood E. D., Armstrong F.A., Richards F. A.** (1967) Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **47**: 23-&
- Yee M.C., Bartholomew J.C.** (1988) Light regulation of the cell cycle in *Euglena gracilis* bacillaris. *Cytometry* **9**: 387-393
- Yoder J. A., Martin J., Nill A.** (1982) Cell division periodicity and the nitrate environment of a marine diatom. *Limnology and Oceanography* **27**: 352-357

- Zachleder V., Kuptsova E. S., Los D. A., Cepăik V., Kubăň Ā., Shapizugov J. M., Semenenko V. E.** (1989) Division of chloroplast nucleoids and replication of chloroplast DNA during the cell cycle of *Dunaliella salina* grown under blue and red light. *Protoplasma* **150**: 160-167
- Zachleder V., Vandenende H.** (1992) Cell cycle events in the green alga *Chlamydomonas eugametos* and their control by environmental factors. *Journal of Cell Science* **102**: 469-474
- Zevenboom W., Mur L.R.** (1981) Simultaneous short-term uptake of nitrate and ammonium by *Oscillatoria agardhii* grown in nitrate-limited or light-limited continuous culture. *Journal of General Microbiology* **126**: 355-363
- Zonneveld C.** (1998) A cell-based model for the chlorophyll a to carbon ratio in phytoplankton. *Ecological Modelling* **113**: 55-70
- Zudaire L., Roy S.** (2001) Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **62**: 26-34

Annexe

Analyse de sensibilité du modèle *FreeCycle* (chapitre VII)

Pour la plupart, les paramètres et conditions initiales du modèle *FreeCycle* sont mesurables ou calculables à partir de nos données. Cependant, certains ne peuvent être estimés par une approche expérimentale, c'est le cas des paramètres fixant les vitesses maximum de passage d'une phase à l'autre (σ_{12} , σ_{2M} et σ_{M1}). Afin de connaître clairement l'effet de chaque paramètre et condition initiale sur les différentes variables, nous avons effectué une étude de sensibilité en faisant varier chaque paramètre et condition initiale de plus ou moins 30%. Les résultats sont exposés dans cette annexe.

Cette étude nous permet tout d'abord d'identifier les paramètres ayant le plus d'effet sur le comportement du modèle : $\bar{\mu}$, ρ_{\max} , Q_{\min} et Q_{\max} . Par exemple, nous retrouvons l'effet négatif d'une diminution $\bar{\mu}$ sur le taux d'acquisition de carbone et d'azote (barres bleus négatives dans la colonne « *mubar* -»). Au contraire, son effet sera positif sur la concentration en substrat dans le bioréacteur (barre bleu foncé positive). Ensuite, cette étude nous permet d'identifier la conséquence sur chaque variable d'une modification des paramètres σ_{12} , σ_{2M} et σ_{M1} . Enfin, elle témoigne de la cohérence de notre schéma conceptuel puisque une variation de 30% des paramètres ajoutés par rapport au modèle *LDBiom* ne font pas exploser le modèle.

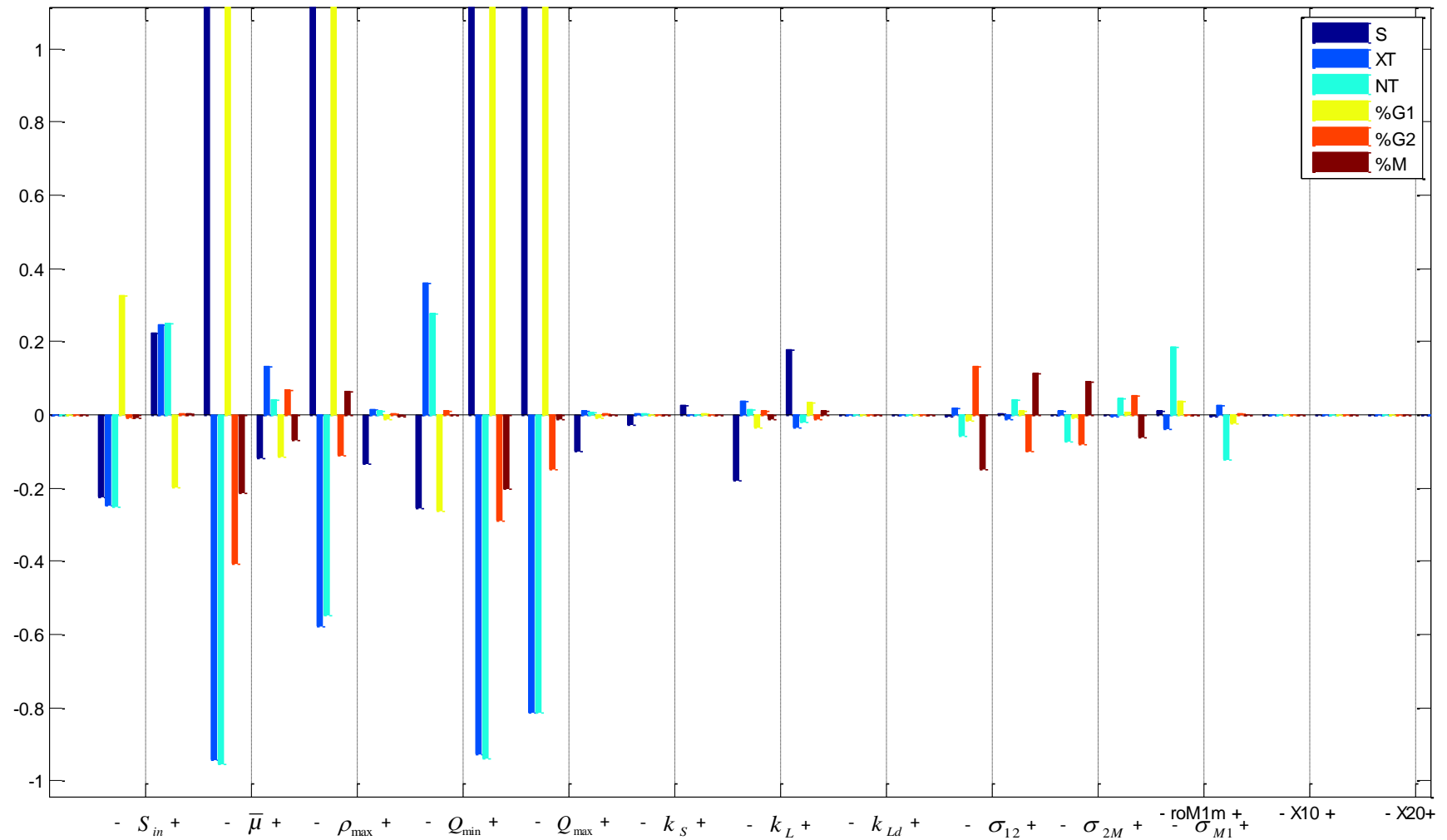


Figure 100. Résultat de l'étude de sensibilité du modèle *FreeCycle*. Chaque paramètre et condition initiale (en abscisse) est modifié de plus (+) ou moins (-) 30%. L'effet relatif sur la moyenne des différentes variables est représenté par les barres de couleur. S : concentration en substrat, XT : concentration en carbone cellulaire, NT : concentration en azote cellulaire, pG1, pG2, pM : proportion de cellules dans les différentes phases du cycle.

Interférence entre les processus mitotiques et la prise d'azote chez *Thalassiosira weissflogii*.

Implications en modélisation et sur les flux globaux.

Le modèle michaëlien d'acquisition d'azote, utilisé à l'origine pour représenter l'effet de la concentration d'un nutriment sur son taux d'absorption, s'avère insuffisant lorsque d'autres facteurs présentent des variations temporelles, à l'exemple du cycle diurne de lumière. Dans la littérature, les oscillations diurnes de l'acquisition d'azote sont généralement expliquées par la réponse du statut physiologique des microalgues au flux de photons et à la disponibilité en substrat. Cette thèse a pour but d'identifier dans quelle mesure le cycle cellulaire conditionne lui aussi la prise d'azote, et le cas échéant d'évaluer l'impact de cette propriété au niveau macroscopique. Pour cela, nous avons réalisé des expériences en cultures continues de la diatomée *Thalassiosira weissflogii* soumise à différentes conditions de lumière et d'azote.

Notre étude met en évidence une diminution de l'acquisition d'azote lorsqu'une proportion significative de la population est en mitose. Il apparaît également que les événements mitotiques sont planifiés à la fois par les conditions de croissance et par une horloge interne. De plus, nos expériences montrent que les conséquences macroscopiques de ces propriétés individuelles sont fonction du degré de synchronisation de la population, et nous détaillons les facteurs agissant sur ce phénomène. Ensuite, nos hypothèses sont reprises dans une approche numérique afin de tester le gain de représentativité obtenu en prenant en compte le cycle cellulaire dans la modélisation de la croissance phytoplanctonique. Enfin, nous discutons de l'effet du cycle cellulaire sur l'acquisition d'azote en milieu marin et de ses possibles implications écologiques.

Mots clés : *acquisition d'azote, cycle cellulaire, synchronisation, statut physiologique, modélisation, phytoplancton, microalgues, diatomées, Thalassiosira weissflogii*

Interference between mitotic processes and nitrogen acquisition in *Thalassiosira weissflogii*.

Implications in modeling and global fluxes.

The Monod model of nitrogen acquisition, originally used to represent the effect of a nutrient concentration on the phytoplankton uptake rate, is inadequate when other factors show temporal variations. Literature generally links the diurnal oscillations of nitrogen acquisition to a response of the physiological status of microalgae to the photon flux and to the substrate availability. This thesis aims to analyze how the cell cycle is also a significant determinant of nitrogen acquisition, and where appropriate, to assess the impact of this property at the macroscopic level. In this purpose, we conducted continuous culture experiments of the diatom *Thalassiosira weissflogii* exposed to various conditions of light and nitrogen supply.

Results reveal a decrease in nitrogen acquisition when a significant proportion of the population is in mitosis. The timing of the mitotic processes appears to be regulated both by the growth conditions and by an internal clock. Moreover, our experiments show that the emergent behavior of the individuals depends on the degree of synchronization the population, and we discuss the factors affecting this phenomenon. Then, our hypotheses are used in a numerical approach in order to assess the gain of representativeness obtained by taking into account the cell cycle in phytoplankton growth models. Finally, we discuss how the cell cycle may impact nitrogen acquisition in the real marine environment and conclude on the possible implications in ecology.

Keywords: *nitrogen acquisition, cell cycle, synchronization, physiological status, modeling, phytoplankton, microalgae, diatoms, Thalassiosira weissflogii*